

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

---

Caracterización de las principales enzimas celulolíticas de *Myceliophthora thermophila* implicadas en la degradación de biomasa lignocelulósica y mejora de la hidrólisis de hemicelulosa para la producción de bioetanol de segunda generación

---

Laura Benítez Casanova  
Sevilla, 2017



## ÍNDICE

<b>LISTADO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Bioetanol como carburante.....</b>	<b>11</b>
1.1.1 Consumo de bioetanol mundial .....	12
<b>1.2 Lignocelulosa .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3 Proceso de obtención de bioetanol de segunda generación .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Organismos degradadores de lignocelulosa .....</b>	<b>19</b>
1.4.1 <i>Myceliophthora thermophila</i> .....	20
<b>1.5 Celulasas.....</b>	<b>22</b>
1.5.1 Endoglucanasas .....	24
1.5.2 Celobiohidrolasas I y II.....	25
1.5.3 $\beta$ -glucosidasas .....	26
1.5.4 Polisácarido monooxigenasa (PMO) .....	27
1.5.5 Sinergismo .....	28
<b>1.6 Hemicelulasas .....</b>	<b>29</b>
1.6.1 $\beta$ -xilosidasa .....	30
<b>1.7 Mejora enzimática para la degradación de la lignocelulosa .....</b>	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Materiales.....</b>	<b>41</b>
3.1.1 Biomasa lignocelulósica .....	41
3.1.2 Cepas .....	41
3.1.3 Plásmidos .....	42
3.1.4 Medios de crecimiento del hongo .....	42
<b>3.2 Métodos.....</b>	<b>43</b>
3.2.1 Actividades Enzimáticas .....	43
3.2.2 Determinación de concentración de proteína .....	49
3.2.3 Purificación de las principales celulasas de <i>Myceliophthora thermophila</i> C1 .....	50
3.2.4 Electroforesis de proteínas.....	53
3.2.5 Caracterización cinética de las enzimas purificadas .....	56
3.2.6 Termorresistencia, termoestabilidad y temperatura óptima .....	58
3.2.7 pH óptimo.....	59
3.2.8 Hidrólisis enzimática de biomasa.....	59
3.2.9 Escrutinio de actividad $\beta$ -xilosidasa en cepas de hongos celulolíticos .....	62
3.2.10 Amplificación, clonación y subclonación del gen <i>bxl 20.17</i> .....	62
3.2.11 Transformación del gen <i>bxl 20.17</i> en <i>M. thermophila</i> C1 .....	66
3.2.12 Fermentación a escala microplaca .....	66
3.2.13 Fermentación en matraz.....	67
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1 Purificación y caracterización de la enzima <math>\beta</math>-glucosidasa 1 de <i>Myceliophthora thermophila</i> C1.....</b>	<b>71</b>
4.1.1 Purificación de la enzima Bgl1 .....	71

4.1.2	Caracterización cinética de la enzima Bgl1 .....	73
4.1.3	Desnaturalización térmica de la enzima Bgl1 .....	75
4.1.4	Termorresistencia de la enzima Bgl1 .....	75
4.1.5	Temperatura óptima de la enzima Bgl1 .....	75
4.1.6	pH óptimo de la enzima Bgl1 .....	75
<b>4.2</b>	<b>Purificación y caracterización de la enzima celobiohidrolasa 1 de</b>	
	<b><i>Myceliophthora thermophila</i> C1.....</b>	<b>76</b>
4.2.1	Purificación de la enzima Cbh1 .....	76
4.2.2	Caracterización cinética de la enzima Cbh1 .....	78
4.2.3	Desnaturalización térmica de la enzima Cbh1 .....	80
4.2.4	Termorresistencia de la enzima Cbh1 .....	81
4.2.5	Temperatura óptima de la enzima Cbh1.....	81
4.2.6	pH óptimo de la enzima Cbh1.....	81
<b>4.3</b>	<b>Purificación y caracterización de la enzima Celobiohidrolasa 4 de</b>	
	<b><i>Myceliophthora thermophila</i> C1.....</b>	<b>82</b>
4.3.1	Purificación de la enzima Cbh4 .....	82
4.3.2	Caracterización cinética de la enzima Cbh4 .....	84
4.3.3	Desnaturalización térmica de la enzima Cbh4.....	86
4.3.4	Termorresistencia de la enzima Cbh4 .....	86
4.3.5	Temperatura óptima de la enzima Cbh4.....	86
4.3.6	pH óptimo Cbh4 .....	86
<b>4.4</b>	<b>Purificación y caracterización de la enzima Endoglucanasa 2 de</b>	
	<b><i>Myceliophthora thermophila</i> C1.....</b>	<b>87</b>
4.4.1	Purificación de la enzima Eg2.....	87
4.4.2	Inhibición de la enzima Eg2 .....	89
4.4.3	Desnaturalización térmica de la enzima Eg2.....	90
4.4.4	Termorresistencia de la enzima Eg2 .....	90
4.4.5	Temperatura óptima de la enzima Eg2.....	90
4.4.6	pH óptimo de la enzima Eg2.....	91
<b>4.5</b>	<b>Prueba funcional para la optimización del cóctel secretado por</b>	
	<b><i>Myceliophthora thermophila</i> C1.....</b>	<b>92</b>
4.5.1	Diseño de un cóctel sintético con el mínimo número de componentes para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica.....	92
4.5.2	Influencia individual de cada una de las celulasas en el cóctel mínimo (CM 6) .....	96
4.5.3	Optimización de las proporciones de las distintas celulasas en el cóctel mínimo (CM 6).....	97
<b>4.6</b>	<b>Búsqueda y expresión de una enzima <math>\beta</math>-xilosidasa en <i>Myceliophthora</i></b>	
	<b><i>thermophila</i> C1 .....</b>	<b>103</b>
4.6.1	Escrutinio de $\beta$ -xilosidasas de hongos celulolíticos .....	104
4.6.2	Amplificación del gen <i>bxl 20.17</i> .....	105
4.6.3	Expresión del gen <i>bxl 20.17</i> en <i>Myceliophthora thermophila</i> C1 .....	107
4.6.4	Hidrólisis de PCS con los sobrenadantes de los clones transformantes de <i>Myceliophthora thermophila</i> C1.....	110
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>113</b>
<b>5.1</b>	<b>La enzima Bgl1 frente a otras <math>\beta</math>-glucosidasas .....</b>	<b>115</b>
5.1.1	Constantes cinéticas de las $\beta$ -glucosidasas .....	118



5.1.2	Termoestabilidad de las $\beta$ -glucosidasas .....	120
5.1.3	Efecto de la temperatura y el pH en la actividad de las $\beta$ -glucosidasas ..	121
<b>5.2</b>	<b>Las enzimas Cbh1 y Cbh4 frente a otras celobiohidrolasas.....</b>	<b>122</b>
5.2.1	Caracterización de las enzimas Cbh1 y Cbh4 .....	128
5.2.2	Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de las celobiohidrolasas.....	131
<b>5.3</b>	<b>La enzima Eg2 frente a otras endoglucanasas .....</b>	<b>133</b>
5.3.1	Caracterización de la enzima Eg2 .....	135
5.3.2	Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de Eg2 .....	136
<b>5.4</b>	<b>Búsqueda de las enzimas para la composición del cóctel mínimo .....</b>	<b>138</b>
5.4.1	Influencia individual de cada una de las celulasas en el cóctel mínimo CM 6	141
5.4.2	Optimización de las proporciones de las distintas celulasas del cóctel mínimo (CM 6) para la hidrólisis de PCS .....	142
5.4.3	Efecto del dominio de unión a carbohidratos de la enzima Cbh1 en la hidrólisis de PCS .....	144
<b>5.5</b>	<b>Mejora en la hidrólisis de hemicelulosa.....</b>	<b>145</b>
5.5.1	Expresión heteróloga del gen <i>bxl 20.17</i> en <i>M. thermophila</i> C1 .....	146
5.5.2	Hidrólisis de PCS por los transformantes de <i>bxl 20.17</i> .....	148
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>149</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>153</b>



## LISTADO DE ABREVIATURAS

ATA	ácido aurin-tricarboxílico
Azo-CMC	azo carboximetil celulosa
BGL	$\beta$ -glucosidasa
CBD	dominio de unión a carbohidratos
CBH	celobiohidrolasa
CDH	celobiosa deshidrogenasa
CHAPS	3-(3-colamidopropil)dimetilamonio.-1-propano sulfonato
CM 4	cóctel mínimo
DMSO	dimetilsulfóxidos
DTT	ditiotreitól
EG	endoglucanasa
GH	familia glicosil hidrolasa
IEF	isoelectroenfoque
MUX	metil umberiferil- $\beta$ -D-xilopiranosido
PASC	celulosa amorfa tratada con ácido fosfórico
PCS	pretreated corn stover (rastroy de maíz pretratado)
PMO	polisacárido monooxigenasa
pNCB	p-nitrofenil $\beta$ -D-celobiosido
pNGP	p-nitrofenil $\beta$ -D-glucopiranósido
pNXP	p-nitrofenil $\beta$ -D-xilopiranósido
<i>pyr4</i>	orotidina-5'-fosfato descarboxilasa

*pyr5*

orotato-fosforribosil transferasa

SDS-PAGE

electroforesis en gel de poliacrilamida  
con dodecilsulfato sódico

$T_m$

temperatura de fusión de proteínas

U

unidad de actividad enzimática

ura/uri

uracilo/uridina

## **1 INTRODUCCIÓN**



## 1.1 Bioetanol como carburante

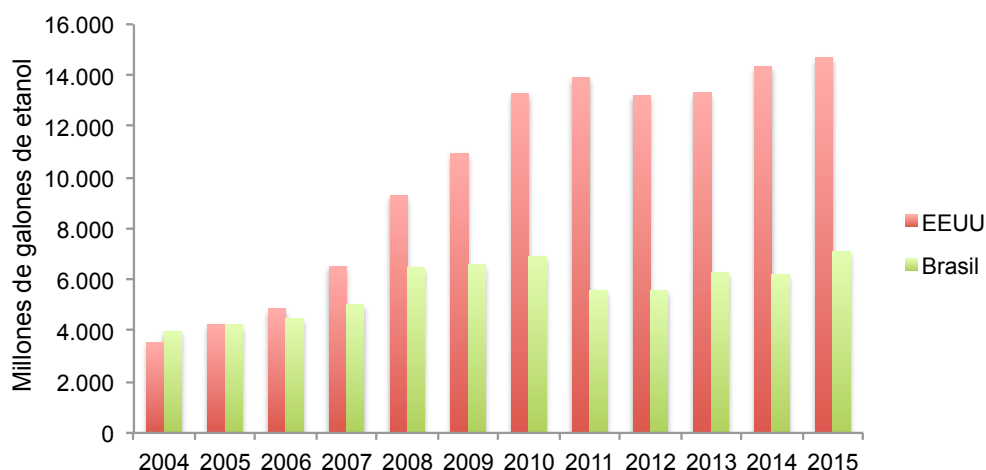
El creciente consumo energético acusado en las últimas décadas, motivado por el aumento de la población y la progresiva industrialización de los países, es hoy en día principalmente dependiente del crudo, lo que ha provocado el aumento del precio del mismo. Junto con este factor, el hecho de que sea un recurso natural no renovable así como que sea altamente contaminante, ha disparado la búsqueda de fuentes de energías renovables y más sostenibles con el medio ambiente. El uso de fuentes de energía alternativas implica el aprovechamiento de los recursos naturales, como pueden ser la energía solar, eólica, hidráulica o la biomasa lo que reduce el uso de petróleo.

A fecha de junio de 2015, un 86% del consumo de energía mundial es dependiente del combustibles fósiles, mientras que tan sólo un 2,8% deriva de energías renovables (Petroleum B. 2015). Dentro del sector del transporte la cifra aumenta a una dependencia del 98% de los combustibles derivados del petróleo (Gómez y col., 2008). Debido a este hecho, el Departamento de Energía de la Oficina del Programa de Biomasa de Estados Unidos ha desarrollado una iniciativa en el que pretende que el 30% de la gasolina sea sustituido por biocarburantes para 2030 (U.S. Department of Energy, Office of the Biomass Program). De igual manera, en la Unión Europea se ha desarrollado un programa en el que una cuarta parte de los carburantes utilizados en transporte deben ser derivados de biocarburantes para 2030 (Biofuels Research Advisory Council). En este contexto es en el que aparece el bioetanol como una de las alternativas más plausibles para sustituir y/o reducir el consumo de crudo, siendo actualmente el biocombustible con mayor producción mundial. El bioetanol es una fuente de energía renovable producida a partir de la fermentación de azúcares.

El etanol como biocarburante se ha posicionado como una de la mejores alternativas frente a la gasolina debido a que tiene mayor octanaje, alto calor de vaporización y baja presión de vapor, a la vez que produce menos emisiones de CO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub> (Thangavelu y col., 2016). El principal uso que se le ha dado al etanol es como carburante, generalmente mezclado en distintas proporciones con gasolina siendo la más utilizada la E10 (90% gasolina + 10% etanol) y E85 (15% gasolina + 85% etanol). Además puede ser usado como combustible único, siendo necesaria la modificación de los motores que utilizan esta fuente de hidrocarburos. Otro de los principales usos ha sido como aditivo de la gasolina. Tradicionalmente uno de los aditivos más consumidos ha sido el metil terbutil éter (MTBE), usado para aumentar el octanaje de la gasolina. Este compuesto se ha demostrado altamente tóxico y contamina las aguas subterráneas (Sun Y. y col., 2002). Alternativamente se puede usar un derivado del etanol como aditivo, el etil terbutil éter (ETB), que se consigue a partir del etanol en su reacción con el isobuteno.

### 1.1.1 Consumo de bioetanol mundial

Los dos principales productores mundiales son Estados Unidos y Brasil, que juntos producen el 85% del total de etanol (Renewable Fuels Association, RFA). En los últimos tiempos se ha observado un incremento en la producción de etanol, triplicando los valores de producción en Estados Unidos en tan sólo 6 años (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Producción de etanol de EEUU y Brasil entre los años 2004 y 2015 (RFA)

Los valores de producción de etanol hacen referencia a la producción de este biocombustible de primera generación, donde se aprovecha el contenido en almidón de productos agrícolas. En Brasil la materia prima utilizada para la obtención de etanol es la sacarosa proveniente de la caña de azúcar, mientras que en Estados Unidos el almidón del maíz es la fuente principal. Otros cultivos como la remolacha, el trigo o el sorgo también son utilizados para la producción de bioetanol. El uso de productos alimentarios para este fin supone, además de un problema ético por la merma de recursos, el encarecimiento de dichas materias primas, lo que aumenta los costes totales de la producción del biocombustible. En Europa la Directiva de promoción de Energías Renovables (Directiva 2009/28/CE, 2009) fija un objetivo global del 20% de energías renovables en el consumo total de energía y una cuota del 10% de energías renovables en el transporte, incluidos los biocombustibles, en 2020. Para alcanzar estos objetivos sin provocar el riesgo de alteración de precios de los productos alimentarios o pérdida de biodiversidad se hace necesaria la implementación de la producción de combustibles de segunda generación, aquellos que aprovechan la lignocelulosa de productos de desecho. Como materias primas para los biocarburantes de segunda generación pueden encontrarse residuos agrícolas (paja de trigo, bagazo de azúcar, rastrojo de maíz, etc.), maderas (álamo, pino, abeto, etc.), residuos celulósicos y residuos sólidos urbanos (Cardona y Sánchez 2007).

El trabajo descrito en esta tesis se centra en el bioetanol de segunda generación a partir de la biomasa lignocelulósica de residuos agrícolas, la cual se ha convertido en una de las tecnologías más importantes en el campo de las energías renovables (Chen y col. 2016). La biomasa lignocelulósica, mayor componente estructural de las



plantas, es la fuente de energía renovable más abundante, debido a su potencial de ser transformada en glucosa y/o azúcares fermentables. Dichos azúcares no se encuentran disponibles en estos materiales, siendo necesario un proceso más costoso para su liberación respecto al proceso de obtención de etanol de primera generación.

## 1.2 Lignocelulosa

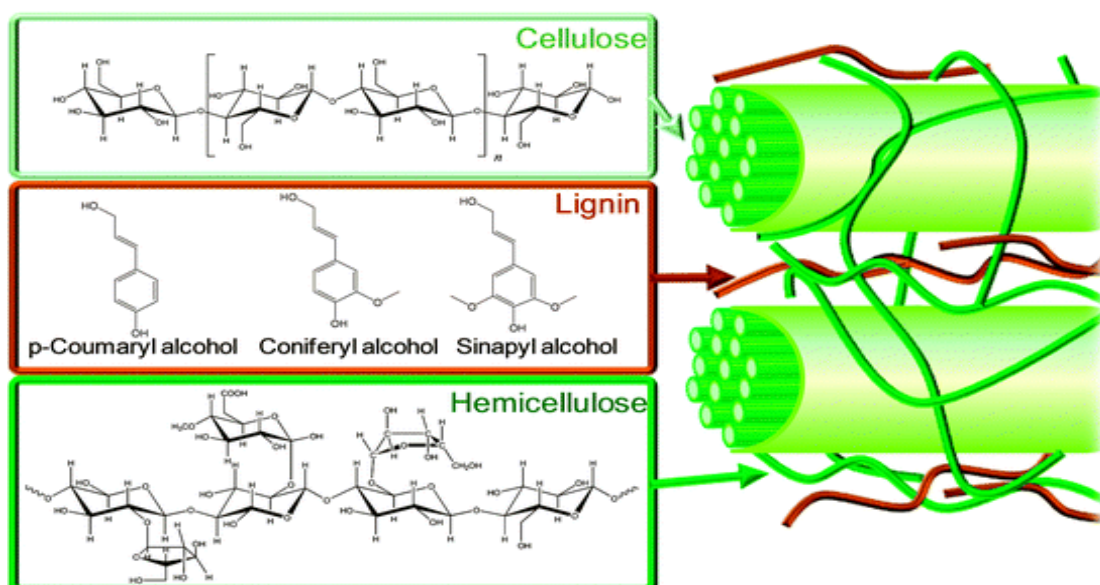
La lignocelulosa es el componente estructural principal de la pared celular de las plantas, siendo su función dar estabilidad, rigidez y protección a la misma. Está compuesta de polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina, variando las proporciones de los mismos en función del tipo de material, de la especie y la edad del cultivo.

La celulosa es un homopolímero de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta(1,4)$  cuyo grado de polimerización puede llegar a las 15000 unidades. Debido al tipo de enlace entre el carbono anomérico (C1) de una molécula de glucosa y el C4 de la siguiente, el polímero tiene una direccionalidad, teniendo un extremo reductor (C1) y un extremo no reductor (C4). Estos polímeros se encuentran formando microfibrillas, que a su vez se asocian con otras mediante puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals para formar las fibras de celulosa (Dashtban y col., 2009). La celulosa se constituye principalmente por regiones cristalinas con un alto grado de ordenación y compactación, aunque también existen ciertas regiones con menor ordenación denominadas amorfas. La naturaleza estructural de la celulosa cristalina la vuelve insoluble en la mayoría de los solventes incluyendo el agua, y evita que sea atacada por enzimas microbianas. A este fenómeno se le conoce como recalcitrancia (Himmel y col., 2007).

El segundo polímero mayoritario de la lignocelulosa es la hemicelulosa, un heteropolímero con menor grado de polimerización pero mayor complejidad que el primero por sus ramificaciones y sustituciones. Está formada por pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa y manosa), compuestos fenólicos (como el ácido ferúlico y p-cumárico) y grupos acetilo. La composición y el tipo de polímero de hemicelulosa presente en las paredes vegetales dependen de la especie. Estructuralmente se compone de una cadena principal de azúcares constituida por uno o dos tipos de monosacáridos, con distintas ramificaciones de azúcares y sustituciones. La clasificación de los distintos polímeros de hemicelulosa se rige por el contenido mayoritario de azúcares en su cadena principal. El xilano supone aproximadamente el 70% de la composición de la hemicelulosa. Es un polímero de residuos de D-xilosa con enlaces  $\beta(1,4)$ , sustituido frecuentemente por residuos de D-galactosa, L-arabinosa, ácido glucurónico, grupos acetilo y ácido ferúlico. Otros polímeros formados por un único tipo de azúcares en su cadena principal son el manano, el arabinano o el galactano. Entre los polímeros cuya cadena principal está constituida por dos tipos de azúcares se encuentran el xiloglucano, arabinoxilano o galacto(gluco)manano entre otros (de Souza y col., 2013).

De los tres tipos de polímeros que componen la lignocelulosa, la hemicelulosa es la más sensible a los procesos termo-químicos, pudiendo ser solubilizada en las condiciones de temperatura y pH correctos. La hemicelulosa se encuentra entrelazada entre las fibras de celulosa unidas por puentes de hidrogeno, actuando como nexo de unión entre la lignina y la celulosa.

Por último el tercer componente principal de la lignocelulosa es la lignina. Éste polímero se caracteriza por dar rigidez a la pared celular y actuar como barrera frente al ataque de químicos o patógenos. Su composición le da un carácter hidrofóbico que aporta impermeabilidad a la planta. Se trata de uniones éter o carbono-carbono entre unidades de alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico formando un polímero de composición variada y distintas ramificaciones en función de la especie (Souza y col., 2013).



**Figura 1.2** Composición de la lignocelulosa. Se muestran las microfibras de la celulosa formando las fibras con los polímeros de hemicelulosa entrelazados haciendo de nexo de unión con los polímeros de lignina (Alonso y col., 2012).

Como se ha descrito previamente la composición de la lignocelulosa es totalmente dependiente del tipo de cultivo. Asimismo la severidad del pretratamiento utilizado en el proceso de obtención del bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica dará lugar a distintas composiciones en función del grado de degradación de la hemicelulosa y lignina en el material. En la Tabla 1.1 se recoge la composición de algunas biomásas lignocelulósicas utilizadas para producción de bioetanol.

**Tabla 1.1** Composición de distintos materiales lignocelulósicos

Componente	Rastrojo de maíz pretratado (2)	Bagazo de caña de azúcar pretratado (2)	Paja de trigo pretratada (3)	Paja de cebada (4)
<b>Glucano</b>	35,8	39,6	56,7	33,1
<b>Xilano</b>	5,3	24,1	7,8	20,2
<b>Galactano</b>	0,8	0,0	N/D	0,9
<b>Arabinano</b>	0,7	0,6	0,7	3,8
<b>Manano</b>	0,6	0,2	N/D	-
<b>Lignina</b>	21,1	25,3	23,6	16,1
<b>Cenizas</b>	5,9	3	6,3	-
<b>Acetato</b>	0,8	0,7	N/D	N/D

Notas:

5 Se representa en porcentaje de cada uno de los componentes.

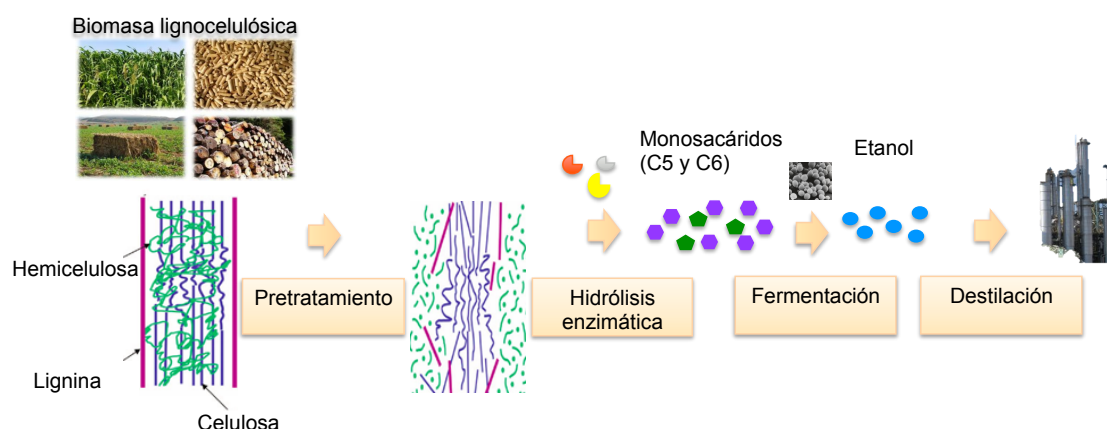
6 Composición determinada en la planta piloto de biomasa de Abengoa Bioenergy en York, Nebraska

7 Kristense y col., 2008

8 García-Aparicio y col. 2006

### 1.3 Proceso de obtención de bioetanol de segunda generación

En el proceso de obtención de bioetanol de segunda generación los azúcares se encuentran formando parte de polímeros estructurales de las paredes celulares de las plantas (celulosa, hemicelulosa y lignina), no encontrándose disponibles para la conversión a etanol por la levadura por lo que necesitan de tratamientos previos para la liberación de los azúcares simples. El proceso global a partir de biomasa lignocelulósica consta de las siguientes etapas descritas a continuación y resumidas en la Figura 1.3:



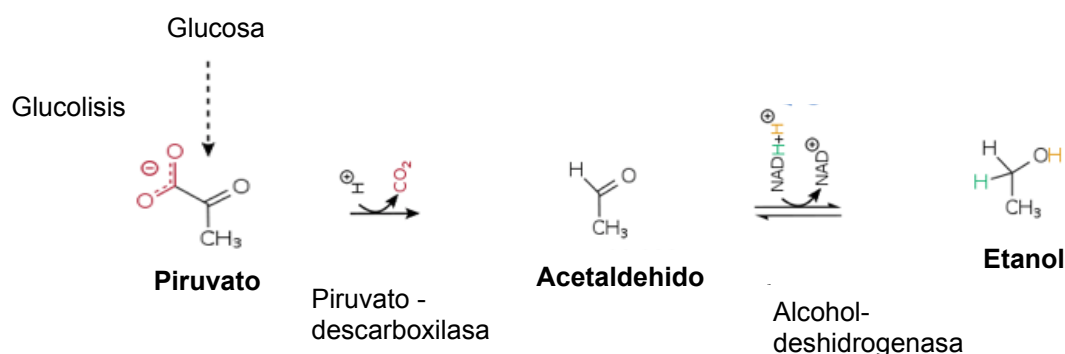
**Figura 1.3.** Etapas del proceso de obtención del bioetanol de segunda generación a partir de biomasa lignocelulósica.

- I. Pretratamiento. El objetivo del pretratamiento es la eliminación parcial de la lignina y la hemicelulosa así como disminuir el grado de cristalinidad de la celulosa y aumentar la porosidad de la biomasa (Kristensen y col., 2008). Este proceso modifica la estructura nativa de las fibras para facilitar la accesibilidad de las enzimas degradadoras de lignocelulosa, necesarias en la posterior etapa de hidrólisis. El pretratamiento debe cumplir los siguientes requisitos: mejorar la liberación de azúcares durante el mismo o en la posterior hidrólisis enzimática; evitar la degradación o pérdida de hidratos de carbono; evitar la formación de subproductos inhibidores de las posteriores etapas de hidrólisis y fermentación; y finalmente, ajustarse a la rentabilidad (Sun y col., 2002). Existen distintos métodos para llevar a cabo el pretratamiento, que se pueden clasificar en químicos, aquellos en los que se emplean ácidos, bases o solventes para la modificación estructural de la lignocelulosa; físicos, donde se incluye la molienda, presión y temperatura para la disminución del tamaño de partícula y aumento del área accesible; físico-químicos donde se combinan cambios de temperatura y presión con el uso de ácidos o bases (la explosión de vapor es el más utilizado); o biológicos en los que se aprovechan las enzimas lignolíticas de algunos microorganismos, principalmente hongos basidiomicetos, para la eliminación de la lignina que resulta el componente más difícil de degradar, siendo este método el menos agresivo y de menor coste energético, pero también el menos controlable (Dong 2013). El tipo de material lignocelulósico así como las características del pretratamiento utilizado condicionan las propiedades del material, variando la accesibilidad de la celulosa, el grado de polimerización y su composición, lo que puede influir en la formulación del cóctel enzimático y la dosis del mismo para una óptima degradación de la biomasa.
  
- II. Hidrólisis enzimática. Tras el pretratamiento el siguiente paso es la conversión de la celulosa y hemicelulosa a monómeros de hexosas y pentosas mediante la acción combinada de celulasas, hemicelulasas y enzimas auxiliares. Teniendo en cuenta la complejidad y variabilidad de los materiales, para llevar a cabo la completa degradación de los polímeros ha de haber una combinación óptima de las distintas actividades enzimáticas en función del material y del pretratamiento utilizados. En la naturaleza esta función ha sido desarrollada por diferentes microorganismos que utilizan materia lignocelulósica como fuente de carbono. Desde bacterias anaeróbicas presentes en el rumen y tracto intestinal de los animales herbívoros e insectos como escarabajos y termitas, bacterias aerobias presentes en aguas residuales hasta hongos basidiomicetos de la podredumbre blanca u hongos filamentosos (Martínez y col., 2008), existe una gran variedad de organismos con capacidad de producir enzimas hidrolíticas que pueden ser utilizados en la industria para llevar a cabo la hidrólisis de los polímeros de celulosa y hemicelulosa. Para ello se han de fijar unas condiciones de proceso en las que las enzimas puedan actuar eficientemente, que suele ser en el rango de 45°-55°C y pH 4.8-5.8. Estas condiciones de temperatura favorecen la solubilización de los componentes de la lignocelulosa ya que disminuyen la viscosidad de la biomasa y así facilitan la licuefacción. Para incrementar las concentraciones de etanol al final del proceso, la hidrólisis se suele llevar a cabo

a altas concentraciones de sólidos totales entre 15-22% durante 24-80h (Chen y col., 2016). La sacarificación o hidrólisis enzimática ha sido durante muchos años la principal limitación para la rentabilidad del proceso de obtención del bioetanol lignocelulósico, existiendo factores limitantes tanto a nivel de sustrato como de la enzima. Entre los factores limitantes dependientes del sustrato, podemos contar la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización, la superficie disponible, el porcentaje de humedad y el contenido de lignina (Hendriks y col., 2009). Como factores limitantes dependientes de los mecanismos de acción de las enzimas se encuentran la desnaturalización o estabilidad de las propias enzimas, las uniones inespecíficas y la inhibición por producto o por otros compuestos presentes en la hidrólisis.

Debido a que la cantidad de enzimas necesaria para la hidrólisis impacta muy significativamente en el coste final del etanol, se están realizando en la actualidad grandes esfuerzos enfocados en la mejora enzimática, teniendo como objetivo económico lograr una contribución de la enzima al coste del bioetanol lignocelulósico de 40 centavos de dólar por galón (Tao y col. 2014).

- III. Fermentación. Los monosacáridos obtenidos de la hidrólisis enzimática de la lignocelulosa se transforman en etanol por fermentación alcohólica mediada por cepas industriales de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En el caso de las hexosas, la levadura incorpora la glucosa del medio y la convierte en piruvato a través de la glucólisis. Este piruvato es llevado a acetaldehído y este a su vez a etanol gracias a la acción catalítica secuencial de la enzima piruvato descarboxilasa y la enzima alcohol deshidrogenasa (Figura 1.4).



**Figura 1.4** Fermentación alcohólica de la glucosa.

La utilización industrial de la levadura *S. cerevisiae* para la producción de bioetanol se ve beneficiada por los altos niveles de producción que alcanza así como su tolerancia al etanol y a los productos inhibitorios presentes en la biomasa, además de crecer bien a pH relativamente bajos lo que protege el proceso de la contaminación por bacterias. Sin embargo está limitado a la fermentación de glucosa, ya que *S. cerevisiae* no es capaz de metabolizar la xilosa, que representa en torno al 40% de los azúcares resultantes de la

hidrólisis de la lignocelulosa. Para aprovechar la xilosa liberada se están generando cepas modificadas genéticamente para conseguir fermentar este azúcar. En la naturaleza existen dos rutas metabólicas para la incorporación de la xilosa. La primera se da en algunas especies de levaduras, donde ésta pentosa se reduce a xilitol mediante la xilosa reductasa (XR), tras lo cual el xilitol es oxidado a 5-xilulosa por la xilitol deshidrogenasa (XDH). La xilulosa es fosforilada por la xilulokinasa (XK), y entra en la ruta de las pentosas fosfato y la glucólisis para finalmente ser fermentada a etanol. En la segunda ruta metabólica, presente en bacterias y algunos hongos, la asimilación de la xilosa es llevada a cabo por la xilosa isomerasa (XI) que cataliza la conversión de xilosa en xilulosa en un único paso. A continuación seguiría la misma ruta que en levaduras.

En los últimos años se han construido distintas cepas de *S. cerevisiae* expresando genes para estas rutas con el fin de mantener el potencial fermentativo de la levadura tradicional. Una de las estrategias ha sido la expresión heteróloga de los genes que codifican para XR y XDH, para la cual los genes más utilizados han sido los de la levadura *Scheffersomyces stipitis*. Otra de la estrategias ha sido la introducción del gen que codifica para la XI de organismos como el hongo anaerobio *Piromyces* sp E2 o la bacteria *Clostridium phytofermentans*. De manera paralela se ha realizado la sobreexpresión de la XK endógena y de transportadores de azúcares (Moysés y col., 2016).

Aunque existen levaduras naturales que pueden llevar a cabo la fermentación tanto de glucosa como de xilosa a etanol, estas levaduras poseen una serie de limitaciones para su utilización industrial en la conversión de los azúcares procedentes de biomasa lignocelulósica a etanol. Estas limitaciones son principalmente, la baja eficiencia fermentativa en presencia de inhibidores liberados durante el pretratamiento como los furfurales, la baja tolerancia al etanol y la represión por glucosa, que lleva a que la fermentación de las pentosas se retrase hasta que se hayan consumido la glucosa de forma que para cuando se inicia la conversión de la xilosa, los niveles de etanol son demasiado altos e inhiben el proceso. Actualmente se trabaja en la modificación genética de algunas de estas cepas de levaduras naturales que fermentan conjuntamente hexosas y pentosas, como *Pachysolen tannophilus*, *Scheffersomyces (Candida) shehatae*, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, y *Spathaspora Passalidarum*, para mejorar la tolerancia a inhibidores, la producción de etanol así como la desrepresión por glucosa (Harner y col., 2015).

De igual manera que con la xilosa, se está trabajando en la modificación genética de cepas industriales para la fermentación de otros azúcares como la arabinosa, presente en torno a un 5% tras la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica (Zhang y col., 2015)

#### IV. Destilación. Tras la fermentación se ha de recuperar el etanol del mosto



fermentado, para lo cual se precisa de columnas de destilación, en donde se separa una mezcla de alcohol/agua de una suspensión acuosa de sólidos que se retira por el fondo. A través de los métodos convencionales de destilación es posible obtener etanol con concentraciones cercanas a la composición azeotrópica (96% en peso); sin embargo, para que el etanol pueda ser mezclado con la gasolina es necesario que su contenido de agua sea muy bajo, con el fin de evitar la formación de dos fases líquidas en la mezcla. La primera alternativa puesta en consideración para superar el punto azeotrópico consiste en modificar las condiciones de operación de la destilación, las cuales abarcan desde la aplicación de alto vacío hasta la adición de solvente; dichas modificaciones varían los coeficientes de actividad de la mezcla. Posteriores a las técnicas de destilación, que involucran operaciones líquido-vapor, se han introducido otras que utilizan los principios de adsorción y permeación: entre ellas se destacan la utilización de zeolitas y membranas de pervaporación, y como propuestas alternas se encuentran los procesos híbridos que combinan diferentes técnicas y procesos. Estos procesos alcanzan una pureza de 99,5% de etanol (Frolkova y col. 2010) .

#### 1.4 Organismos degradadores de lignocelulosa

Las celulasas son enzimas sintetizadas por una gran diversidad de organismos entre los que se incluyen hongos y bacterias. La función de estas enzimas en la naturaleza ha sido el uso del material celulósico como fuente de carbono. Estas enzimas pueden ser inducibles por el crecimiento de microorganismos en materiales celulósicos. Entre los principales géneros estudiados para la producción de celulasas se encuentran *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* y *Aspergillus* (Kuhad y col., 2011, H.M. Hassan y col., 2016). Sin embargo, de todos los organismos degradadores de celulosa, los hongos filamentosos son los responsables de la vasta mayoría de la degradación de biomasa en la naturaleza. Los hongos han colonizado distintos ambientes desde terrestres hasta marinos y son de vital importancia para el reciclaje del carbono en la Tierra, una capacidad con implicaciones ecológicas, bioquímicas, agrónomas y recientemente como aplicación industrial. El uso de estos microorganismos en la industria es debido a que pueden llegar a producir una batería de enzimas con altos niveles de producción y eficiencia catalítica que secretan al medio de cultivo, facilitando su recuperación para los distintos usos industriales. Cabe destacar las especie *Trichoderma reesei*, en concreto el mutante supersecretor RUT-C30 (ATCC 56765), como uno de los hongos filamentosos más utilizados para la producción de enzimas celulolíticas y proteínas recombinantes, así como para la investigación académica, que puede llegar a producir 40 g/L de proteína (Peterson y col., 2012). Existen en el mercado cócteles enzimáticos basados en la modificación genética de *T. reesei* como Cellic® CTec2 de la empresa Novozymes (<http://www.novozymes.com>).

Las especies *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus niger*, así como otros hongos del género *Aspergillus*, han sido utilizados ampliamente en la industria por el gran número de genes que codifican para celulasas, hemicelulasas y pectinasas, cobrando mayor importancia las dos últimas (Sherief y col., 2010, De Souza 2013, De Vries y col., 2001). Existen además preparados comerciales de  $\beta$ -glucosidasa de *A. niger* que se han convertido en el estándar de este tipo de enzimas.

Por otro lado en los últimos años el género *Penicillium* se ha posicionado como uno de los géneros más adecuados para la producción de celulasas de manera industrial. Cepas como *Penicillium brasilianum* o *Penicillium janthinellum* cuentan con una alta expresión de  $\beta$ -glucosidasa y celobiohidrolasa tipo 1, llevando a cabo la hidrólisis de la celulosa a unos niveles comparables a los de *T. reesei*. Conjuntamente, sus enzimas cuentan con una baja afinidad por la lignina, lo que se traduce en una menor inhibición por uniones inespecíficas con este polímero (Marjamaa y col., 2013).

#### 1.4.1 *Myceliophthora thermophila*

*Myceliophthora thermophila* es un hongo termófilo descomponedor de restos vegetales, en cuyo genoma están identificados más de 200 genes que codifican para celulasas, hemicelulasas y enzimas accesorias para la degradación de la pared celular de las plantas, repartidos en 7 cromosomas (Tabla 1.2). Se diferencia de otras especies de hongos industriales como *T. reesei* o *A. niger*, por la presencia en el genoma de un elevado número de enzimas polisacáridos monooxigenasas (PMO), previamente conocidas como GH61 (Karnaouri y col., 2014). A partir de un aislado de este organismo, inicialmente clasificado como *Chrysosporium lucknowense* C1, la empresa americana Dyadic International Inc. construyó la plataforma de expresión *Myceliophthora thermophila* C1, para la producción de enzimas y otras proteínas de interés industrial. Esta plataforma fue desarrollada desde la década de 1990 por mutagénesis al azar inducida por UV y agentes mutagénicos como la nitrosoguanidina, generando una cepa supersecretora (Visser y col., 2011). Con las sucesivas mutagénesis la cepa C1 adquirió adicionalmente un beneficioso fenotipo: una viscosidad del cultivo líquido hasta 50 veces inferior a la cepa parental. Los desarrollos iniciales se enfocaron a la producción de celulasas de aplicación en industria textil aunque dada la capacidad de secreción del organismo, posteriormente se aplicó a otros productos o procesos como la producción de bioetanol.



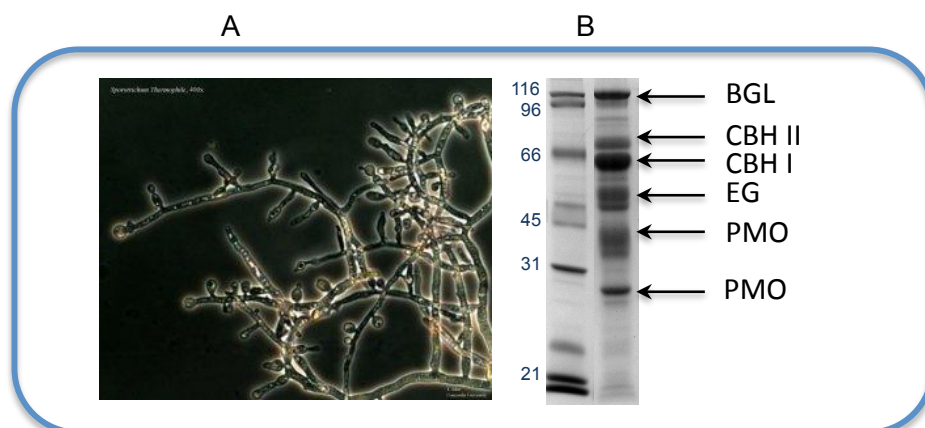
**Tabla 1.2.** Número de genes que codifican para enzimas degradadoras de las paredes vegetales presentes en el genoma de *M. thermophila* C1.

Actividad	Número de genes en <i>Myceliophthora thermophila</i> C1
$\beta$ -glucosidasa	7
endoglucanasa + celobiohidrolasa	13
polisacarido monooxigenasa	26
Celobiosa deshidrogenasa	9
$\beta$ -xilosidasa	5
xilanasa	13
arabinoxilano hidrolasas	7
esterasas	13
$\alpha$ -glucuronidasa	2
arabinasas + arabinofuranosidasas	7

Las ventajas que ofrece *M. thermophila* C1 para su uso industrial como productor de enzimas celulolíticas son importantes. Se alcanzan altos niveles de producción superiores a 100 g/L de los que entre un 60-80% son celulasas. Posee una baja viscosidad que permite una mejor mezcla y transferencia de oxígeno y nutrientes, es fácilmente escalable para el manejo industrial. Las condiciones de fermentación de esta cepa son versátiles y económicas, pudiendo crecer en un rango de pH de 4,5 a 8,8 y a una temperatura de 25 a 44°C y utilizar los nutrientes habituales en la fermentación a gran escala.

Se dispone de numerosas herramientas genéticas para la modificación de este microorganismo, desde promotores constitutivos e inducibles a distintos marcadores de selección. En concreto la selección de los transformantes se basa en la complementación de la auxotrofia para la síntesis de uridina por la introducción de casetes de expresión que codifican para la orotato-fosforribosil transferasa (*pyr5*) o la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa (*pyr4*) en las correspondientes cepas auxótrofas de *M. thermophila* C1. Tiene una alta eficiencia en transformación y la integración en el genoma es estable. El tipo de transformación más usada en este organismo es la transformación de los protoplastos mediada por polietilenglicol.

Otra de las ventajas que existen para trabajar con *M. thermophila* C1 es que su genoma se encuentra secuenciado y anotado (Joint Genome Institute, University of California, [http:// genome.jgi-psf.org](http://genome.jgi-psf.org); Berka y col. 2011). La secuencia de aminoácidos de las glicosil hidrolasas de este hongo demuestran una alta similitud (entre un 70-85%) con las enzimas de *Chaetomium spp.*, *Hemicola spp.*, *Neurospora crassa*, mientras que presentan menos similitud con las enzimas de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Phanerochaete*.



**Figura 1.5** (A) Hifas de *M. thermophila* al microscopio. Tomada de Joint Genome Institute. (B) SDS-PAGE del caldo extracelular industrial de *M. thermophila* C1.

Actualmente la cepa industrial de *M. thermophila* C1 ha sufrido una serie de modificaciones genéticas para la eficiente conversión de biomasa lignocelulósica. La sobreexpresión de una  $\beta$ -glucosidasa endógena, de distintas polisacáridos monooxigenasas o la delección de genes que codifican para actividades perjudiciales o enzimas improductivas son algunas de estas modificaciones.

El caldo industrial secretado por *M. thermophila* C1 se compone principalmente de endoglucanasas, polisacárido monooxigenasas, celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas en proporciones optimizadas. La acción conjunta y sinérgica de estas enzimas dan lugar a la hidrólisis eficiente de biomasa lignocelulósica alcanzando elevados niveles de conversión de glucano a etanol.

## 1.5 Celulasas

La degradación de la celulosa hasta glucosa es llevada a cabo por la acción conjunta de las llamadas celulasas y la  $\beta$ -glucosidasa. En primer lugar las endoglucanasas (EG) hidrolizan los enlaces glucosídicos  $\beta(1,4)$  de zonas internas de la cadena de celulosa generando nuevos sitios de unión para la acción de las celobiohidrolasas o exoglucanasas (CBH). Éstas son enzimas procesivas que comienzan la degradación desde un extremo de la cadena liberando oligómeros de glucosa, mayoritariamente el disacárido celobiosa. Por último actúa la  $\beta$ -glucosidasa (BGL) que hidroliza los dímeros de celobiosa o pequeños oligómeros de glucosa, obteniendo como producto final el monómero de glucosa. Existen enzimas auxiliares que ayudan a la degradación de la celulosa, como es el caso de las polisacárido monooxigenasas (PMO) que producen cortes oxidativos en las cadenas de celulosa.

Las celulasas pueden ser proteínas solubles secretadas de manera individual como en el caso de los hongos, o pueden formar un complejo multienzimático asociado a la célula, como en el caso de bacterias anaeróbicas. En este complejo, que recibe el nombre de celulosoma, una proteína no catalítica sirve de andamio o anclaje

a varias subunidades enzimáticas mediante interacciones proteína-proteína de tipo cohesina-dockerina (Lynd y col., 2002). Debido al mayor interés industrial que poseen las enzimas solubles secretadas, en los próximos apartados nos centraremos en este tipo de celulasas.

Estructuralmente las celulasas se componen de un dominio catalítico y un dominio de unión a carbohidratos (CBD) conectados por un péptido de unión flexible o *linker* rico en serina, treonina y prolina. El CBD facilita la unión específica y adsorción de la enzima a los polímeros de celulosa, ya que tiene afinidad por ésta debido a que en su superficie se encuentran residuos aromáticos que le proporcionan carácter hidrofóbico (Martínez-Anaya y col., 2008). Esta cualidad permite que se incremente la concentración de enzimas en la superficie de los polímeros. Se ha descrito que la presencia del CBD mejora la acción catalítica de las celulasas en celulosa cristalina mientras que no afecta la actividad en celulosa amorfa o sustratos solubles (Le Costaouëc y col., 2013). Los CBDs pueden tener desde 30 a 200 aminoácidos y se clasifican según su secuencia. Los CBDs de celulasas fúngicas pertenecen a la familia 1. Sin embargo, existen celulasas que carecen de CBD.

Existen dos mecanismos de acción para estas enzimas, dependiendo de la familia a la que pertenezcan: retención o inversión. La hidrólisis del enlace glucosídico mediante el mecanismo de retención ocurre en dos etapas en la que están implicados dos residuos del sitio activo de la enzima. En la primera etapa (glicosilación) se produce un intermediario entre el grupo carboxilo de un residuo de la enzima y el glucósido. En el segundo paso (deglicosilación) el grupo carboxilo del otro residuo se une a una molécula de agua que dirige el ataque nucleofílico para hidrolizar el complejo intermediario, dando el producto hidrolizado y restableciendo la enzima a su estado catalítico inicial (Withers 2001). Este mecanismo es utilizado para la hidrólisis del enlace glucosídico por endoglucanasas o celobiohidrolasas de la familia GH7. En el caso del mecanismo de inversión tiene lugar en una sola etapa, mediante un proceso catalítico ácido-base. Uno de los dos residuos catalíticos opera como base, facilitando el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico y el otro, como ácido, asistiendo la separación del oxígeno. El mecanismo de inversión es utilizado por celobiohidrolasas de la familia GH6 entre otras.

La celulasas son glicoproteínas de manera que las modificaciones postraduccionales más frecuentes en las celulasas es la glicosilación, restringiendo la N-glicosilación al sitio catalítico de la enzima y la O-glicosilación al péptido de unión, dejando el dominio de unión a carbohidratos libre de modificaciones postraduccionales. En la N-glicosilación un oligosacárido del tipo Glc3Man9GlcNAc2 se une a un residuos de asparragina susceptibles de ser glicosilados (Asn-X-Ser/Thr). En la O-glicosilación los azúcares se añaden al grupo hidroxilo –OH de residuos de serina y treonina. La glicosilación del péptido de unión, rico en serina, protege de la acción proteolítica de las serín proteasas evitando la separación del CBD del dominio catalítico. La glicosilación de las celulasas aporta multiplicidad, estabilidad y modifica la actividad de las enzimas (Juturu y col., 2014).

Las enzimas son secretadas al medio completamente N-glicosiladas y O-glicosiladas sufriendo un proceso de *triming* o eliminación de azúcares en el caldo de

cultivo. La modificación postsecretorial de estas proteínas es debida a actividades extracelulares como  $\alpha(1,2)$ -manosidasa,  $\alpha(1,3)$ -glucosidasa y N-acetilglucosaminidasas en el caso de la N-glicosilación, encontrada en el sitio catalítico, mientras que para el linker O-glicosilado las fosfatasas y las manosidasas son las actividades principales responsables de la modificación (Stals y col., 2004). El patrón de glicosilación encontrado en las distintas proteínas es dependiente de las condiciones de cultivo, afectado por la fuente de carbono y/o nitrógeno o el pH.

### 1.5.1 Endoglucanasas

La actividad catalítica de las enzimas endoglucanasas (EC 3.2.1.4) es la hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\beta(1,4)$  internos de los polímeros de celulosa, de manera aleatoria. Pueden pertenecer a diversas familias de las glicosil hidrolasas como GH 5, 6, 7, 9, 12 y 45. Dependiendo de la familia que pertenezcan tienen una mayor especificidad por unos sustratos u otros. Mientras las enzimas de la familia GH7 son capaces de hidrolizar sustratos de pequeño tamaño como el pNPC (paranitrofenil celobiósido), el resto de familias no muestra actividad sobre estos sustratos. En general tienen mayor afinidad por las regiones amorfas del polímero de celulosa, como se demuestra por una alta actividad frente a sustratos como carboximetil celulosa o PASC (celulosa amorfa tratada con ácido fosfórico), y prácticamente una actividad nula para sustratos como Avicel (celulosa cristalina) (Vlasenko y col., 2010). La hidrólisis del enlace glucosídico ocurre mediante un mecanismo de retención. Gran parte de las endoglucanasas fúngicas descritas pertenecen a la familia GH5, familia que incorpora además enzimas con actividad 1,6-galactanasa, 1,3-mananasa, 1,4-xilanasas y actividad xiloglucanasa. Generalmente no son enzimas procesivas, aunque algunas endoglucanasas bacterianas muestran una moderada acción procesiva, teniendo un mecanismo distinto a las celobiohidrolasas (Payne y col., 2015).

Su inhibidor principal es la celobiosa aunque se ha descrito que algunas endoglucanasas se ven inhibidas por glucosa. Debido a la complejidad de la composición del hidrolizado del material lignocelulósico pretratado, con multitud de azúcares con diversos grados de polimerización así como derivados de lignina y acetato, diferentes compuestos pueden actuar como inhibidores de forma cooperativa de forma que el efecto del conjunto es mayor que la suma de los efectos individuales.

La masa molecular de estas enzimas oscila entre 22-50 kDa. Estructuralmente suelen constar de un dominio catalítico, conectado por un péptido de unión a un dominio de unión a carbohidratos (CBD) de hasta 5 kDa, pudiendo ser separado por proteólisis con papaína (Uzcategui y col., 1991a). Existen también algunas endoglucanasas de menor tamaño que no poseen CBD (Henriksson y col., 1999).

La glicosilación es la modificación postraducciona l más representada en las endoglucanasas. Gusakov (2008) demostró que uno de cada tres residuos de asparragina susceptibles de ser N-glicosilados en la enzima Eg2 de *M. thermophila*, resultaba estar ocupado. Además demostró que esta enzima presentaba una

glicosilación variable, lo que significa que el mismo residuo puede tener diferentes longitudes del oligosacárido, dando lugar a distintos patrones de glicosilación.

### 1.5.2 Celobiohidrolasas I y II

Las enzimas celobiohidrolasas son enzimas hidrolíticas que cortan los enlaces de  $\beta(1,4)$  del glucano de forma procesiva partiendo de extremos libres de las cadenas de celulosa. Su principal producto es la celobiosa, pudiendo liberar también pequeños oligómeros de glucosa. Mientras que las endoglucanasas actúan sobre las regiones amorfas de la celulosa, las celobiohidrolasas llevan a cabo la hidrólisis de las zonas más cristalinas de los polímeros de celulosa.

Son enzimas procesivas, lo que significa que efectúan varios eventos hidrolíticos en los polímeros de celulosa antes de disociarse de ella. Este proceso incluye al menos las etapas de adsorción a la zona cristalina de la celulosa, descristalización y apertura de las cadenas de celulosa, hidrólisis, expulsión del producto y desorción (Payne et al. 2015). La etapa limitante de la acción de las enzimas CBH en ausencia de enzimas sinérgicas es la disociación del sustrato, ya sea causada por obstáculos o regiones amorfas de celulosa. En presencia de enzimas sinérgicas la etapa limitante es la velocidad procesiva (los pasos de hidrólisis, expulsión del producto y el movimiento procesivo).

Principalmente pertenecen a dos familias de glicosil hidrolasas, GH6 y GH7. Las celobiohidrolasas tipo I (EC 3.2.1.176), pertenecientes a la familia GH7, actúan sobre los extremos reductores de las cadenas de celulosa, mientras que las celobiohidrolasas tipo II (EC 3.2.1.91), de la familia GH6, actúan sobre los extremos no reductores, siendo así complementarias para la degradación eficiente de la celulosa. Además de esta diferencia, las enzimas celobiohidrolasas de la familia GH7 actúan mediante un mecanismo de retención, al igual que las endoglucanasas previamente descritas. En el caso de las enzimas pertenecientes a la familia GH6 el mecanismo de acción es por inversión.

Son enzimas monoméricas con una masa molecular entre 50 y 65 kDa. Típicamente de estructura modular, constan de un dominio catalítico y un dominio de unión a carbohidratos (CBD) conectados por un péptido de unión. Los dos módulos pueden ser separados por la acción catalítica de la papaína, que libera un CBD de entre 4 y 5 kDa (Uzcategui y col., 1991b).

Al igual que las endoglucanasas, su inhibidor principal es la celobiosa, su producto de reacción, pudiendo ser también inhibidas por glucosa. Otros componentes presentes en la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica como compuestos fenólicos o altas concentraciones de acetato pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre este tipo de enzimas.

Las celobiohidrolasas son las celulasas más abundantes en la naturaleza. En el

conjunto total de proteína secretada por *M. thermophila* C1 hasta un 40% de la proteína son celobiohidrolasas de tipo I y II.

### 1.5.3 $\beta$ -glucosidasas

Las enzimas  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21), catalizan la hidrólisis del enlace  $\beta(1,4)$  de un residuo terminal  $\beta$ -D-glucósido no reductor, liberando una molécula de  $\beta$ -D-glucosa. Su actividad es, por tanto, la última participante en la degradación de la celulosa a monómeros de glucosa. Algunas  $\beta$ -glucosidasas fúngicas han demostrado actuar sobre celodextrinas, de manera que aceleran el ratio de hidrólisis de la celulosa.

La endoglucanasa y la celobiohidrolasa generalmente son inhibidas por la celobiosa, por lo que en el contexto de la degradación de la celulosa, la  $\beta$ -glucosidasa evita dicha inhibición hidrolizando la celobiosa presente a glucosa. Sin embargo, la glucosa puede ser inhibidor de la  $\beta$ -glucosidasa, lo que puede suponer un cuello de botella en el proceso (Sørensen y col., 2013).

Tradicionalmente las  $\beta$ -glucosidasas han seguido dos criterios de clasificación basados en la especificidad de sustrato o en la identidad de la secuencia nucleotídica. Basándose en la especificidad de sustrato, estas enzimas se han clasificado como arilo  $\beta$ -glucosidasas, que actúan sobre arilo-glucósidos, verdaderas celobiasas, que hidrolizan celobiosa para liberar glucosa, y enzimas de amplia especificidad de sustrato, que actúan sobre un amplio espectro de sustratos. La mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas caracterizadas se encuentran en la última categoría (Singhania y col., 2013). El método más aceptado de clasificación es por la identidad de las secuencia de nucleótidos, propuesto por Henrissat y Bairoch (1996), basado en las similitudes en la secuencia y en el plegamiento de estas enzimas. La mayoría de las BGL fúngicas pertenecen a la familia glicosil hidrolasa 3, así como un gran número de enzimas provenientes de levaduras y bacterias.

La mayoría de las enzimas  $\beta$ -glucosidasas caracterizadas muestran una mayor actividad con sustratos análogos como el p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido (pNGP) que con su sustrato natural, celobiosa. Esto es debido a que la cinética de las  $\beta$ -glucosidasas depende de la configuración del sustrato y para la hidrólisis de la celobiosa se requiere un cambio conformacional. El sitio de unión a sustrato S1 de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, donde se acomoda la primera glucosa de la celobiosa, es rígido, por lo que para que la segunda glucosa de la celobiosa acceda al sitio de unión a sustrato se debe provocar un cambio conformacional usando el enlace  $\sigma$  del glucosido. Dicho cambio conformacional no es necesario en el caso del pNGP donde el nitrofenol sigue el mismo patrón que la glucosa (Nam y col., 2010).

Las enzimas  $\beta$ -glucosidasas constan de un único módulo catalítico. Carecen de CBD, lo cual es lógico ya que su sustrato es soluble. La localización de estas enzimas puede ser tanto intracelular, asociada a la pared celular, así como extracelular. En



hongos filamentosos principalmente se restringen al espacio extracelular o intracelular, requiriendo esta última localización del transporte de la celobiosa al interior celular mediante permeasas (Baldrian y col., 2008).

#### 1.5.4 Polisacárido monooxigenasa (PMO)

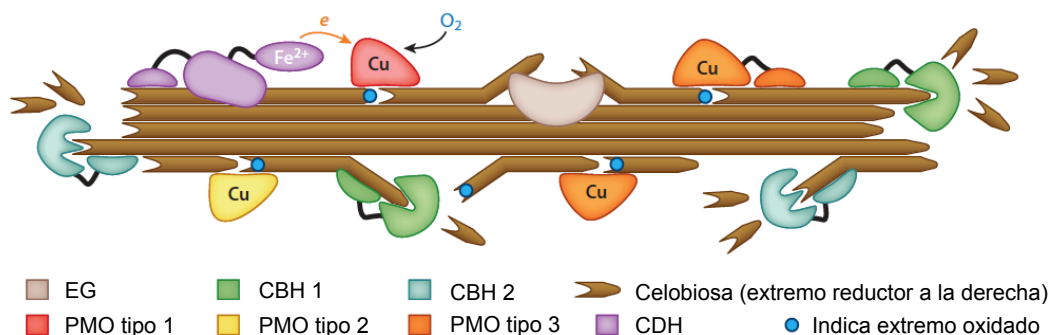
Tradicionalmente se asumía que la degradación de la celulosa se producía por la acción sinérgica de las distintas celulasas. Recientemente se han identificado unas enzimas accesorias que estimulan la hidrólisis de la pared celular y que se encuentran presentes tanto en bacterias como en hongos. Son las polisacárido monooxigenasas, enzimas oxidativas que inicialmente fueron clasificadas erróneamente como GH61 por su aparente actividad endoglucanasa. Actualmente pertenecen a la familia AA9, caracterizadas como polisacárido monooxigenasas dependientes de cobre, que contiene residuos de histidina altamente conservados implicados en un centro activo de cobre tipo 2. Estas enzimas actúan directamente sobre la celulosa, haciéndola más accesible y generando nuevos sitios de unión para las celobiohidrolasas. El corte oxidativo de la celulosa catalizado por este tipo de enzimas requiere de oxígeno molecular y una fuente de electrones que puede ser el producto de la celobiosa deshidrogenasa (CDH) o pequeños agentes reductores presentes en la biomasa lignocelulósica (Levasseur y col., 2013).

Dentro de las enzimas PMO, pertenecientes al grupo AA9, existen 3 tipos o subfamilias principales clasificadas por correlación entre la filogenia y la regioselectividad de oxidación. Las enzimas PMO de tipo 1 son aquellas que generan productos oxidados en el C1 formando aldonolactonas; las PMO tipo 2 son aquellas que generan productos oxidados en el C4 formando 4-cetoaldosas; las PMO tipo 3 oxidan tanto C1 como C4 con menor especificidad que los otros dos tipos. Se ha descrito que dentro de la familia 3 existe un subconjunto de enzima fúngicas, llamado PMO3\*, que parece haber perdido su actividad en C4 y tan sólo lleva a cabo su acción en C1 (Beeson y col., 2015). En la Figura 1.6 se representa un esquema de la degradación de la celulosa mediado por los distintos tipos de PMO.

En algunas enzimas PMO fúngicas el sitio catalítico está unido mediante un péptido de unión flexible a un dominio de unión a carbohidratos de tipo 1. Aunque los miembros de cada familia de las PMO comparten una baja identidad en sus secuencias, hasta la fecha, las enzimas identificadas comparten un alto grado de similitud en la estructura tridimensional (Beeson y col., 2015)

Además de llevar a cabo su actuación sobre la celulosa se ha demostrado que las enzimas PMO actúan sobre la hemicelulosa, en concreto sobre los polímeros de xiloglucano y xilano, catalizando la oxidación de la glucosa y xilosa de las cadenas independientemente de las sustituciones que tengan (Agger y col., 2014, Frommhagen y col., 2015, Kojima y col., 2016).

La aplicación de estas enzimas accesorias en la degradación de la biomasa lignocelulósica y su efecto sinérgico con las celulasas dan lugar a cócteles enzimáticos de mayor eficiencia. Este fenómeno permite disminuir las dosis de enzima necesarias para la hidrólisis en el proceso de obtención de bioetanol, lo que trasladado a la industria supone un ahorro económico cuantioso (Teter 2012, Johansen y col., 2016).



**Figura 1.6.** Modelo de la degradación de la celulosa por celulasas fúngicas. Las celobiohidrolasas (CBH 1 y CBH 2) actúan en los extremos de las cadenas de celulosa generando azúcares solubles que serán degradados a glucosa por la  $\beta$ -glucosidasas (no indicado en el esquema). Las endoglucanasas (EG) y las polisacárido monooxigenasas (PMO) aumentan la accesibilidad de la celulosa a las CBHs creando nuevos sitios de unión internos en las regiones amorfas y cristalinas respectivamente. Las enzimas PMO requieren de un agente reductor que puede ser el producto de la celobiosa deshidrogenasa (CDH) colocalizada en la superficie de la celulosa. Adaptado de Beeson y col., 2015.

### 1.5.5 Sinergismo

Se han descrito cuatro tipos de sinergismo en los sistemas celulolíticos: (1) sinergismo entre endocelulasas y exocelulasas, (2) sinergismo entre celobiohidrolasas que actúan sobre extremos reductores y aquellas que actúan sobre extremos no reductores, (3) sinergismo entre endocelulasas procesivas y endo- o exocelulasas, y (4) sinergismo entre  $\beta$ -glucosidasas y otras celulasas (Vuong y col., 2009). Este fenómeno depende de varios factores, incluido las propiedades fisicoquímicas del sustrato y el ratio individual de cada enzima. De estos, el fenómeno más estudiado ha sido el sinergismo endo-exo generalmente explicado porque la acción de las endoglucanasas genera nuevos sitios de unión para las celobiohidrolasas. Jalak y col., (2012) proponen un mecanismo paralelo en el que la degradación de las regiones amorfas de la celulosa por las endoglucanasas evita la detención de las celobiohidrolasas, acelerando de esta manera la velocidad de degradación.

Existen además otros tipos de sinergismo entre celulasas y las llamadas enzimas accesorias. Éstas pueden ser desde polisacárido monooxigenasas, cuya acción genera más sitios de unión para la celulasas siempre que se encuentra presente un agente reductor, hasta xilanasas, las cuales hidrolizan los polímeros de xilano mejorando la accesibilidad de las enzimas a sustrato y evitando posibles



obstáculos para la acción de las enzimas procesivas. Sin embargo, el efecto sinérgico de las celulasas con este tipo de enzimas es estrictamente dependiente del tipo de sustrato hidrolizado y sus características (Hu y col 2013).

La sinergia mostrada por celulasas y enzimas accesorias permite reducir las dosis de proteína utilizadas para la degradación completa de la biomasa lignocelulósica.

## 1.6 Hemicelulasas

Como se ha descrito previamente, la hemicelulosa es el segundo polímero más abundante en las paredes de las plantas. Su compleja estructura, compuesta por un polímero principal con ramificaciones de distinta estructura y composición, hace necesaria la presencia de una batería de enzimas específicas para su completa degradación. En concreto para la hidrólisis de la cadena principal del xilano se requiere la acción de la  $\beta$ -1,4-endoxilanasas y la  $\beta$ -xilosidasa; la hidrólisis de la cadena principal del xiloglucano es llevada a cabo por las  $\beta$ -1,4-xiloglucanasas y la  $\beta$ -glucosidasa, mientras que la  $\beta$ -1,4-endomananasas y la  $\beta$ -1,4-manosidasa se necesitan para la hidrólisis del (galacto-)manano.

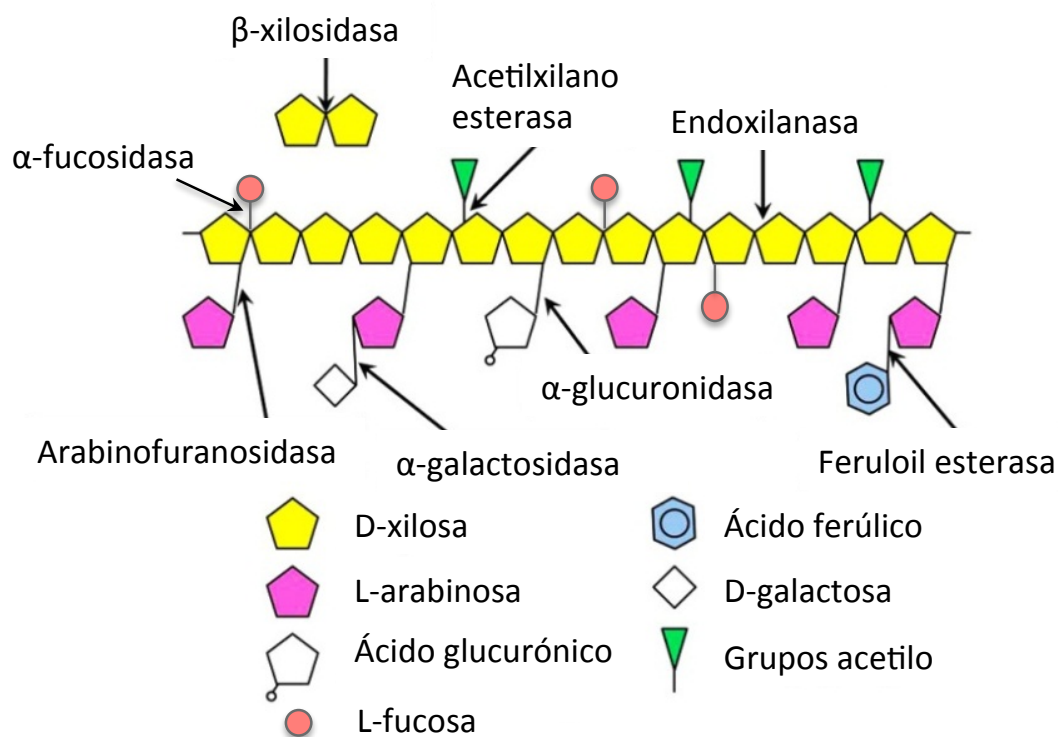
Las enzimas **endoxilanasas** (EC 3.2.1.8) pertenecen a las familias GH10 y GH11. Las enzimas de la familia GH10 tienen un mayor rango de especificidad de sustrato en comparación con las de la familia GH11. Las endoxilanasas pertenecientes a la familia GH10 no sólo degradan los polímeros lineales de xilosa sino también aquellos con un alto grado de sustituciones y pequeños xilo-olisacaridos (van den Brink y col., 2011). Por lo tanto, las enzimas de la familia GH10 son importantes para la completa degradación del xilano ramificado y en principio con una mayor cantidad de endoxilanasas GH10 son necesarias menos enzimas accesorias.

Las **xiloglucanasas** hidrolizan enlaces de  $\beta$ (1,4) glucano en glucanos sustituidos, tales como xiloglucano. Pertenecen a las familias GH12 y GH74 y la principal diferencia entre ambas familias es el mecanismo de acción, ya que la familia GH12 lleva a cabo la hidrólisis del enlace por retención mientras que la familia GH74 lo realiza por inversión (Master y col., 2008).

Las **endomananasas** (EC 3.2.1.78), involucradas en la degradación de los polisacáridos de manano, pertenecen a la familia GH5 y GH26, aunque la mayoría de las endomananasas fúngicas están dentro de la primera familia. Pueden tener un dominio de unión a carbohidratos, que como en el caso de las celulasas pertenece a la familia 1. Los residuos de manobiosa y manotriosa liberados son hidrolizados por la enzima  **$\beta$ -1,4-manosidasa** (EC 3.2.1.85), perteneciente a la familia GH2 (Do y col., 2009).

Para la completa degradación de la hemicelulosa han de ser hidrolizadas las ramificaciones liberando la cadena principal del polisacárido. Para ello actúan distintas

enzimas representadas en la Figura 1.7: arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), para la eliminación de los residuos de L-arabinosa que sustituyen el arabinoxilano;  $\alpha$ -xilosidasas para los residuos de xilosa unidos por enlace  $\alpha$  en las ramificaciones;  $\alpha$ -fucosidasas (EC 3.2.1.51) para hidrolizar los residuos de L-fucosa del xiloglucano;  $\alpha$ -galactosidasas (EC 3.2.1.22) para hidrolizar los residuos de D-galactosa unidos por enlace  $\alpha$  al xilano y al galactomanano;  $\alpha$ -glucuronidasas (EC 3.2.1.39) para los residuos de ácido glucurónico del xilano; acetil-xilano esterasas (EC 3.1.1.72), para eliminar los residuos de acetilo del xilano; y feruloil esterasas (EC 3.1.1.73) para los residuos de ácido cumárico y ferúlico del xilano (van den Brink y col., 2011). Sin embargo, dependiendo del tipo y severidad del pretratamiento, muchos de estos enlaces se hidrolizan durante el proceso y la necesidad de diversidad enzimática es menor.



**Figura 1.7.** Hemicelulasas degradadoras de los polímeros de xilano. Los polímeros de xilano son degradados por la acción de las endoxilasas y las  $\beta$ -xilosidasas que hidrolizan la cadena principal del polímero. Para facilitar la acción de estas enzimas se requiere la eliminación de los residuos que azúcares, compuestos fenólicos y grupos acetilos, llevada a cabo por las distintas enzimas específicas. Adaptado de Aro y col., 2005.

### 1.6.1 $\beta$ -xilosidasa

Para la degradación completa de la hemicelulosa se requiere de la acción de la enzima  $\beta$ -xilosidasa (EC 3.2.1.37) que hidroliza los xilo-oligosacaridos resultantes de la acción previa de las hemicelulasas desde el extremo reductor, liberando monómeros de xilosa. Estas enzimas actúan de manera sinérgica con las

endoxilanasas, eliminando el producto de inhibición de la endoxilanasas que a su vez generan más extremos reductores para la  $\beta$ -xilosidasa (Sunna y col., 1997).

La mayoría de las  $\beta$ -xilosidasas fúngicas pertenecen a la familia GH3, familia compuesta principalmente por  $\beta$ -glucosidasas. Conservan un residuo de aspartato 311 típico de esta familia, pero carecen del residuo conservado de aspartato 120 de las  $\beta$ -glucosidasas, lo que puede explicar la diferencia entre ambos tipos de enzimas (Dodd y col., 2010). Algunas enzimas de este grupo tienen un comportamiento bifuncional. Actúan sobre p-nitrofenilxilósido (pNXP), pNP-arabinósido (pNP-Ara) y/o pNP-glucósido (pNPG) (Lagaert y col., 2014).

Las  $\beta$ -xilosidasas se pueden detectar en distintas localizaciones celulares. Las enzimas bacterianas suelen estar asociadas a la célula, mientras que las de hongos filamentosos se pueden encontrar retenidas en el micelio o secretadas en el caldo de cultivo (Polizeli y col., 2005).

Las  $\beta$ -xilosidasas fúngicas son a menudo glicoproteínas monoméricas, pero se han descrito enzimas que poseen dos o tres subunidades (Sunna y col., 1997). Tienen un peso molecular relativamente alto, entre 60 y 360 kDa. Aunque se ha observado una amplia gama de pH óptimos, la mayoría se encuentran entre 4,0 y 5,0. La temperatura óptima puede variar de 40 a 80°C, pero la mayoría dan mejores resultados a 60°C. Su termoestabilidad es muy variable y depende del organismo en cuestión.

## **1.7 Mejora enzimática para la degradación de la lignocelulosa**

En el proceso de obtención de bioetanol de segunda generación, la disminución de la dosis de proteína requerida para la degradación de la biomasa lignocelulósica impacta directamente y en gran medida en el coste total del proceso. Desde distintos ámbitos se han sugerido diferentes enfoques para mejorar las propiedades de las enzimas o solventar algunos de los inconvenientes a los que se enfrentan éstas durante el proceso, algunos de ellos se revisan a continuación.

Para disminuir la dosis de enzima, una de las estrategias frecuentemente utilizada es la de aumentar la actividad específica de las enzimas. De esta manera enzimas más activas llevarán a cabo la hidrólisis con menor cantidad de proteína. Las técnicas empleadas para tal fin van desde la mutagénesis al azar, la mutagénesis dirigida o el diseño racional. Ésta última técnica se utilizó para aumentar la actividad de la endoglucanasa Cel12B de *Thermotoga maritima* en un 87% (Zhang y col., 2015).

El uso de celulasas termoestables en la hidrólisis es ventajoso, ya que cuentan con una mayor actividad específica y una mayor estabilidad. Además a altas temperaturas se inhibe el crecimiento microbiano y se aumenta la tasa de transferencia de masa debido a la menor viscosidad del fluido. Aunque la

termoestabilidad es una de las propiedades más estudiadas y modificadas por ingeniería genética, no existen reglas establecidas para incrementarla. En general se da por cambios acumulativos de las interacciones hidrofóbicas, electroestáticas y puentes de hidrógeno en la proteína (Viikari y col., 2012). Voutilainen y col., (2014) demostraron que la fusión de distintos CBDs al módulo catalítico de una celobiohidrolasa GH7 dio lugar a una proteína quimérica con mayor termoestabilidad y temperaturas de desnaturalización más altas. Por otro lado Anbar y col., (2010) incrementaron la termoestabilidad de una endoglucanasa, CtCel8A, en 7°C mediante la sustitución de un único residuo de serina por glicina, al igual que Akcapinar y col., (2015) que con métodos computacionales y mutagénesis dirigida aumentaron la termoestabilidad de la endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*.

La glucosa es el producto final de la hidrólisis de la celulosa. Éste monómero es el principal inhibidor de la  $\beta$ -glucosidasa, por lo que su presencia a altas concentraciones en la hidrólisis reduce la capacidad de la enzima de hidrolizar la celobiosa. A su vez, este dímero es inhibidor de las celobiohidrolasas y endoglucanasa, por lo que la sacarificación se ve considerablemente ralentizada. Además, también está descrito que los productos de la degradación de la hemicelulosa pueden inhibir a las celulasas (Bezerra y col., 2005). Para eliminar el producto final y evitar la inhibición una de las técnicas es la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), en la que la glucosa que va siendo liberada es fermentada a etanol. Modificando las constantes de inhibición de las celulasas mediante mutación de distintos residuos se pueden conseguir enzimas resistentes a los productos finales (Lavigne y col., 2011).

La presencia de lignina en la biomasa lignocelulósica es uno de los mayores inconvenientes a los que se enfrentan las enzimas en la hidrólisis enzimática. Además de suponer un obstáculo para la acción de las enzimas, las celulasas y hemicelulasas se unen de manera inespecífica a la lignina por interacciones hidrofóbicas (Rahikainen y col., 2013). La adición de agentes surfactantes como el Tween 20 o polietilenglicol evitan las uniones inespecíficas mejorando la hidrólisis entre un 20-50% (Börjesson y col., 2007). Como alternativa, la búsqueda de enzimas que se vean menos afectadas por la interacción con la lignina puede mejorar el rendimiento de la hidrólisis así como la mutagénesis dirigida del CBD para aumentar la afinidad por la celulosa frente a la lignina (Strobel y col., 2015).

Una manera de reducir la cantidad de enzima requerida es la formulación de cócteles enzimáticos más eficientes específicos para cada tipo de sustrato. La determinación de las enzimas principales y la variación de las proporciones de éstas pueden ayudar a formular cócteles más eficaces en la degradación de materiales lignocelulósicos (Gusakov y col., 2005, Viikari y col., 2012). De igual manera, la adición de enzimas accesorias, como xilanasas o xiloglucanasas, que actúan de manera sinérgica con las celulasas, mejora la hidrólisis del material lignocelulósico. Sin embargo, son altamente dependientes de la composición del sustrato (Hu y col., 2013). Otro tipo de enzimas accesorias son las expansinas, proteínas que inducen la relajación de las paredes celulares de las plantas mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno que unen las fibras de celulosa y/o la celulosa con otros polisacáridos

mediante un proceso no hidrolítico. La adición de proteínas con este tipo de actividad puede reducir la dosis de las celulasas necesarias para la degradación de la celulosa (Kim y col., 2009).

Utilizando otro enfoque, otros investigadores industriales sugieren el reciclado de enzimas para disminuir el consumo de la proteína. En condiciones de proceso industrial (alta temperatura y sólidos totales elevados) se puede llegar a recuperar hasta un 25% del total de la enzima empleada, pudiendo utilizarse para hidrolizar nueva biomasa lignocelulósica (Lindedem y col., 2013).



## **2 OBJETIVOS**





El presente trabajo de tesis doctoral se encuentra estructurado dentro de dos proyectos de investigación.

El primer bloque se encuentra enmarcado dentro del proyecto “Optimización del proceso de obtención de etanol a partir de biomasa” cuyo objetivo general es la mejora del proceso de hidrólisis enzimática mediada por el hongo filamentoso *Myceliophthora thermophila* C1. En el desarrollo de esta tesis se plantean dos objetivos particulares para la guía de la mejora del cóctel enzimático:

- 4 Purificación y caracterización de las principales enzimas celulolíticas del hongo filamentoso *Myceliophthora thermophila* implicadas en la degradación de la lignocelulosa.
- 5 Realización de pruebas funcionales en la que se enfrenten las principales enzimas purificadas en una hidrólisis de biomasa lignocelulósica, para evaluar la implicación de cada una de ellas en el proceso.

El segundo bloque del trabajo de esta tesis se encuentra enmarcado en el proyecto de investigación “Enzyme discovery”, cuyo objetivo general es el descubrimiento de nuevas enzimas que mejoren la degradación de la lignocelulosa. Debido que caldo secretado de *M. thermophila* C1 es deficitario en actividad  $\beta$ -xilosidasa, se plantea la mejora de la hidrólisis de la hemicelulosa mediante dos objetivos:

- 6 Escrutinio de enzimas  $\beta$ -xilosidasa de hongos celulolíticos y caracterización.
- 7 Expresión del gen codificante para una enzima con actividad  $\beta$ -xilosidasa de elección en la plataforma *M. thermophila* C1.



### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1 Materiales

#### 3.1.1 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica utilizada para las hidrólisis enzimáticas fue rastrojo de maíz (Pretreated Corn Stover, PCS) facilitado por la planta piloto de ABN de York (Nebraska, USA) pretratado con 1% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y explosión de vapor. La composición de dicho material se refleja en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Composición de la biomasa lignocelulósica empleada en las hidrólisis enzimáticas

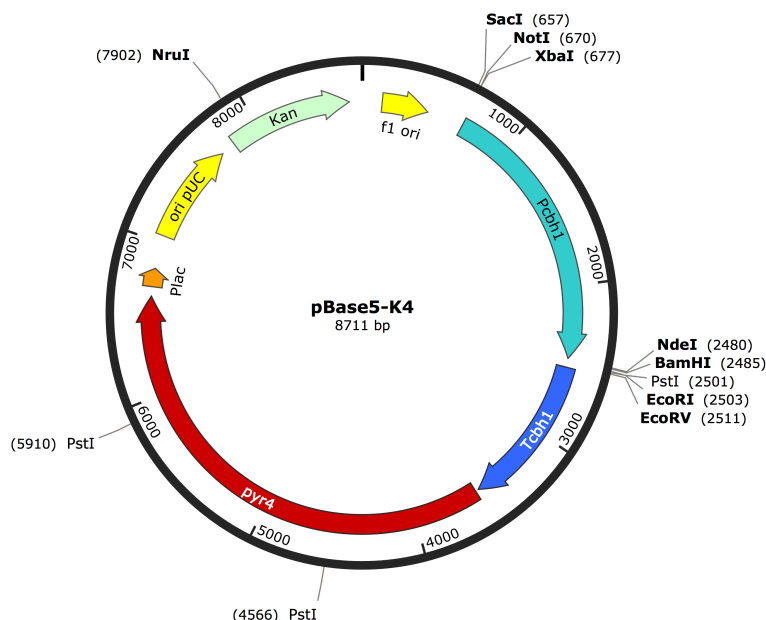
Componente	Rastrojo de maíz pretratado (%)
Glucano	35,82
Xilano	5,33
Galactano	0,78
Arabinano	0,72
Manano	0,55
Lignina	21,05
Cenizas	5,90
Acetato	0,83
<b>Sólidos Solubles</b>	<b>21,09</b>

#### 3.1.2 Cepas

- NEB® 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency). La cepa utilizada para la clonación de el gen *bxl* 20.17 fue *E.coli* DH5α cuyo genotipo es *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR1*.
- *Myceliophthora thermophila* C1. Es la cepa supersecretora de *M. thermophila* proveniente de la cepa UV 18-25. Esta capacidad se adquirió a través de mutagénesis al azar inducida por UV y agentes mutagénicos como la nitrosoguanidina (Punt y col., 2010). La cepa industrial utilizada en el presente trabajo ha sufrido la sobreexpresión de una β-glucosidasa endógena, de distintas polisacáridos monooxigenasas y la delección de genes que codifican para actividades perjudiciales o enzimas improductivas.

### 3.1.3 Plásmidos

- pMBL-T. Genbank: DQ059139 (C0030, Canvax).
- pBase5K-4. Es un vector de expresión de *M. thermophila* derivado del vector comercial pBlueScript II SK+. Este vector se modificó sustituyendo el casete de resistencia a ampicilina por el de kanamicina. Este vector de expresión, contiene aguas arriba la secuencia del promotor de *cbh1* (Pcbh1, 1796 pb) y aguas abajo la secuencia terminadora del mismo gen (Tcbh1, 1009 pb) además del gen *pyr4* (número de acceso en el NCBI XP\_003666633.1) de la misma cepa como marcador de selección (Figura 3.1). El gen *pyr4* codifica una orotidina-5'-fosfato-decarboxilasa funcional y su expresión permite la complementación de la auxotrofia de uridina en la correspondiente cepa huésped *M. thermophila* C1 auxótrofa (*pyr4*) (Díez y col., 2016).



**Figura 3.1** Vector de expresión pBase5-K4 para *M. thermophila* C1.

### 3.1.4 Medios de crecimiento del hongo

Los medio de crecimiento del hongo MM1, MM2, MP1, MP2, MI y MS fueron adaptados de la patente Emalfarb y col. 1998.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Actividades Enzimáticas

#### 3.2.1.1 Medida de actividad $\beta$ -glucosidasa (BGL) con pNGP

Para la determinación de la actividad  $\beta$ -glucosidasa (BGL) con sustrato análogo se midió la formación de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido (pNGP, Sigma N7006), por medio de la modificación del protocolo establecido por Berghem y col. (1974). Para ello se diluyó la muestra en el tampón de ensayo, acetato sódico 200 mM pH 5,0, hasta alcanzar la zona lineal del ensayo comprendida entre 0,1-1 UA. El ensayo se llevó a cabo en tubos de 1,5 mL usándose un volumen de 250  $\mu$ L de enzima previamente atemperado a 50 °C durante aproximadamente 5 min en un termobloque “Eppendorf” modelo “Thermomixer Comfort”. La muestra se mezcló con 250  $\mu$ L de pNGP 0,66 mM (0,2 g/L) de manera que la concentración de sustrato en el ensayo fue de 0,33 mM (0,1 g/L). Se incubó la mezcla durante 10 min exactos a 50°C y posteriormente se paró la reacción con 500  $\mu$ L de carbonato sódico 1 M, de manera que el p-nitrofenol liberado viró a amarillo por el cambio de pH permitiendo la cuantificación de la formación de este compuesto. Se midió la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro marca “Termo Scientific” modelo “Genesys 6”. Para el blanco se procedió de la misma manera sustituyendo la muestra por tampón de ensayo. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Para el cálculo de la actividad se aplicó la siguiente formula:

$$\text{Actividad } \beta - \text{glucosidasa (U/mL)} = \frac{(Abs - BC) \times 1000 \times Vf \times FD}{\epsilon \times Ve \times l \times t}$$

Dónde:

Abs-BC = absorbancia corregida para el blanco a 410 nm.

Vf = volumen final del ensayo ( $\mu$ L).

Ve= volumen de enzima utilizado en el ensayo ( $\mu$ L).

FD = factor de dilución de la enzima previa al ensayo.

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar del nitrofenol a 410 nm ( $15200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

l = paso de luz. En el ensayo en microtubo viene dado por la anchura de la cubeta (1 cm).

t = tiempo de ensayo (min).

Para expresar la actividad específica (U/g) se dividió por la concentración de proteína de la muestra.

### 3.2.1.2 Medida de actividad $\beta$ -glucosidasa (BGL) con celobiosa

Para determinar la actividad  $\beta$ -glucosidasa con sustrato real (celobiosa) se midió la formación de glucosa por medio de la modificación del protocolo establecido por Berghem y col. (1974). El ensayo se realizó en microplaca de 96 pocillos (Nunc) añadiendo 90  $\mu$ L de tampón acetato sódico 200 mM pH 5,0 y 100  $\mu$ L de una disolución de celobiosa 5,8 mM (2 g/L), quedando a una concentración de 2,9 mM (1 g/L) en el ensayo. Se atemperó aproximadamente 5 min a 50°C en termobloque "Eppendorf" modelo "Thermomixer Comfort". La reacción se inició añadiendo 10  $\mu$ L de enzima previamente diluida para llegar a la zona lineal del ensayo. La reacción se incubó durante 10 min a 50°C y se paró mediante choque térmico durante 5 min a 99°C. La glucosa producto de la reacción se midió mediante un HPLC Agilent Technologies 1200/1260 Series con un detector RID y columna Aminex HPX-87H. La fase móvil (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,74%, azida sódica 0,065%) se corrió a un flujo de 0,6 mL/min y la columna se fijó a 60°C de temperatura. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Para el cálculo de la actividad celobiasa se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad celobiasa (U/mL)} = \frac{[\text{glucosa}] \times 1000 \times V_f \times FD}{V_e \times P_m \times t}$$

Donde:

$V_e$  ( $\mu$ L) = volumen de la enzima utilizado en el ensayo.

[glucosa] = concentración de glucosa determinada por HPLC en g/L corregida para el blanco del ensayo (concentración de glucosa en la muestra problema – concentración de glucosa en la muestra blanco).

$V_f$  ( $\mu$ L) = volumen final en  $\mu$ L.

$t$  = tiempo de ensayo en minutos.

$FD$  = factor de dilución de la enzima previa al ensayo.

$P_m$  = peso molecular de la glucosa (g/mol) = 180,1 g/mol.

Para expresar la actividad específica (U/g) se dividió por la concentración de proteína de la muestra.



### 3.2.1.3 Medida de la actividad celobiohidrolasa con pNCB

La actividad celobiohidrolasa (CBH) con sustrato análogo se determinó mediante la formación de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenil β-D-celobiosido (pNCB, Sigma N5759) por medio del protocolo adaptado de Deshpande y col. (1984). Para ello se diluyó la muestra en el tampón de ensayo, acetato sódico 200 mM pH 5,0, hasta alcanzar la zona lineal del ensayo comprendida entre 0,1-1 UA. El ensayo se llevó a cabo en tubos de 1,5 mL usándose un volumen de 250 μL de enzima previamente atemperado a 50 °C durante aproximadamente 5 min en un termobloque “Eppendorf” modelo “Thermomixer Comfort”. La muestra se mezcló con 250 μL de pNCB 0,86 mM (0,4 g/L) de manera que la concentración de sustrato en el ensayo fue de 0,43 mM (0,2 g/L). Se incubó la mezcla durante 10 min exactos a 50°C y posteriormente se paró la reacción con 500 μL de carbonato sódico 1 M, de manera que el p-nitrofenol liberado viró a amarillo por el cambio de pH permitiendo la cuantificación de la formación de este compuesto. Se midió la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro marca “Termo Scientific” modelo “Genesys 6”. Para el blanco se procedió de la misma manera sustituyendo la muestra por tampón de ensayo. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Para el cálculo de la actividad se aplicó la siguiente formula:

$$\text{Actividad celobiohidrolasa (U/mL)} = \frac{(Abs - BC) \times 1000 \times V_f \times FD}{\epsilon \times V_e \times l \times t}$$

Dónde:

Abs-BC = absorbancia corregida para el blanco a 410 nm.

V<sub>f</sub> = volumen final del ensayo (μL).

V<sub>e</sub> = volumen de enzima utilizado en el ensayo (μL).

FD = factor de dilución de la enzima previa al ensayo.

ε = coeficiente de extinción molar del nitrofenol a 410nm (15200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

l = paso de luz. En el ensayo en microtubo viene dado por la anchura de la cubeta (1 cm).

t = tiempo de ensayo (min).

Para expresar la actividad específica (U/g) se dividió por la concentración de proteína de la muestra.

#### 3.2.1.4 Medida de la actividad celobiohidrolasa con Avicel PH-101

La actividad celobiohidrolasa se determinó mediante la formación de celobiosa a partir de celulosa microcristalina, Avicel PH-101, por medio de la modificación del protocolo establecido por Berghem y col. (1974). Para este ensayo se diluyó la enzima en agua destilada hasta un rango comprendido entre 0,1 y 1,0 g/L de contenido de proteína, asegurando de esta manera que no se consuma más del 10% de sustrato y se encuentre dentro de la zona lineal del ensayo. En un tubo de 1,5 mL se pesó 10 mg de Avicel PH-101 y se añadió 200 µl de tampón de ensayo acetato sódico 200 mM pH 5,0, 50 µL de muestra y hasta un volumen final de 1 mL de agua destilada. Cuando el ensayo se utilizó para el seguimiento de la purificación se añadieron 50 µL de enzima β-glucosidasa purificada con una actividad de 400 U/mL con el sustrato pNGP, para hidrolizar la celobiosa producto a glucosa y poder acoplarlo a un ensayo de detección de glucosa. El ensayo se incubó durante 120 min a 50°C en agitación a 1400 rpm en un termobloque "Eppendorf" modelo "Thermomixer Comfort". Transcurrido el tiempo del ensayo se detuvo la reacción mediante choque térmico a 99°C durante 5 min y se centrifugó a 16800 x g durante 5 min. Para el blanco se procedió de la misma manera sustituyendo la muestra por tampón de ensayo. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Para la caracterización cinética el sobrenadante se filtró con un filtro de nylon de 0,22 µm para analizar la celobiosa producto mediante HPLC Agilent Technologies 1200/1260 Series con un detector RID y columna Aminex HPX-87H. La fase móvil (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,74%, azida sódica 0,065%) se corrió a un flujo de 0,6 mL/min y la columna se fijó a 60°C de temperatura.

Para el cálculo de la actividad celobiohidrolasa se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad celobiohidrolasa (U/mL)} = \frac{[\text{celobiosa}] \times 1000 \times V_r \times F_D}{t \times P_m \times V_e}$$

Donde,

[celobiosa] = concentración de celobiosa obtenida en el ensayo (g/L)

V<sub>r</sub> = volumen de la reacción (µL)

F<sub>D</sub> = factor de dilución de la enzima

t = tiempo de reacción (min)

P<sub>m</sub> = peso molecular de la celobiosa 360,3 g/mol

V<sub>e</sub> = el volumen de enzima utilizado en la reacción (µL)

Para expresar la actividad específica (U/g) se dividió por la concentración de proteína de la muestra.

#### 3.2.1.4.1 Determinación de glucosa por el método de la glucosa oxidasa/peroxidasa para la determinación de la actividad celobiohidrolasa

En el caso del seguimiento de la purificación la actividad celobiohidrolasa se determinó analizando la glucosa producto mediante una adaptación del método de la glucosa oxidasa/peroxidasa con el kit GOPOD (Megazyme). Para ellos se mezclaron en una microplaca de 96 pocillos 280  $\mu$ L de reactivo GOPOD y 20  $\mu$ L del producto de la reacción del ensayo sobre Avicel. Como patrones se utilizaron estándares de glucosa a 0,25 g/L y 0,5 g/L. Se incubó durante 20 min a 50°C y se leyó la absorbancia a 510 nm. La concentración de glucosa se calculó por interpolación a la absorbancia de los estándares de glucosa. El ensayo de detección de glucosa se realizó por triplicado. Para el cálculo de la actividad celobiohidrolasa utilizando la glucosa producto se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad celobiohidrolasa (U/mL)} = \left( \frac{[\text{glucosa} - BC] \times 1000 \times V_r \times FD}{t \times P_m \times V_e} \right) / 1,8$$

Donde,

[glucosa-BC] = concentración de glucosa obtenida en el ensayo (g/L) restando la glucosa obtenida del blanco.

$V_r$  = volumen de la reacción ( $\mu$ L)

FD = factor de dilución de la enzima

$t$  = tiempo de reacción (min)

$P_m$  = peso molecular de la celobiosa 180,2 g/mol

$V_e$  = volumen de enzima utilizado en la reacción ( $\mu$ L)

Para expresar la actividad específica (U/g) se dividió por la concentración de proteína de la muestra.

#### 3.2.1.5 Medida de actividad endoglucanasasa

La actividad endoglucanasas, fue medida con el sustrato análogo Azo-carboximetil celulosa (Azo-CMC, Sigma Aldrich 18693) mediante la modificación del protocolo establecido por McCleary (1980). La reacción se llevó a cabo a una concentración final de 1% en tubos de 1,5 mL. Se incubó 250  $\mu$ L de enzima, previamente diluida hasta el rango lineal del ensayo (0,1-0,8 UA corregidos con el blanco) y atemperada a 50°C en un termobloque “Eppendorf” modelo “Thermomixer Comfort”, con 250  $\mu$ L de sustrato Azo-CMC 2% en tampón acetato sódico 200 mM pH

5,0. La reacción se incubó durante 10 minutos, y posteriormente se paró con 1000 µL de solución precipitante (80% etanol, 40 g/L de acetato sódico, 4 g/L de acetato de zinc). Tras la parada se dejó precipitar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos. Se midió absorbancia del sobrenadante a 590nm en un espectrofotómetro marca “Termo Scientific” modelo “Genesys 6”. Para el blanco se procedió de la misma manera sustituyendo la muestra por tampón de ensayo. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

El cálculo de actividad se realizó mediante una recta de regresión con celulasa de *Aspergillus niger* comercial a 50°C y pH 5,0 (Sigma Aldrich- 22178).

$$\text{Actividad EG Azo-CMC (U/mL)} = (-0,1242x^2 + 0,2933x) * \text{FD}$$

Donde:

x = absorbancia medida a 590 nm restando la absorbancia del blanco.

FD = factor de dilución de la enzima utilizado en el ensayo.

Para expresar la actividad específica (U/g) se dividió por la concentración de proteína de la muestra.

### 3.2.1.6 Medida de la actividad β-xilosidasa

La cuantificación de la actividad beta-xilosidasa (BXL) con sustrato análogo se determinó mediante la formación de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenil β-D-xilopiranosido (pNXP, Calbiochem 487870), por medio de la modificación del protocolo establecido por Berghem y col. (1974). Para ello se diluyeron las muestras en el tampón de ensayo, acetato sódico 200 mM pH 5,0, 10 veces o hasta llegar a la zona lineal del ensayo (comprendida entre 0,1-1 UA). El ensayo se llevó a cabo en tubos de 1,5 mL. Se usó un volumen de 250 µL de enzima atemperándose a 50 °C durante aproximadamente 5 min en un termobloque “Eppendorf” modelo “Thermomixer Comfort”. La muestra se mezcló con 250 µL de pNXP a 0,2 g/L de manera que la concentración de sustrato en el ensayo es 0,1 g/L. Se incubó la mezcla durante 10 min exactos a 50°C tras lo cual se paró la reacción con 500 µL de carbonato sódico 1M, de manera que el p-nitrofenol liberado viró a amarillo por el cambio de pH permitiendo la cuantificación de la formación de este compuesto. Se midió la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro marca “Termo Scientific” modelo “Genesys 6”. Para el blanco se procedió de la misma manera sustituyendo la muestra por tampón de ensayo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Para el cálculo de la actividad se aplicó la siguiente formula:

$$\text{Actividad } \beta - \text{xilosidasa (U/mL)} = \frac{(\text{Abs} - \text{BC}) \times 1000 \times V_f \times \text{FD}}{\epsilon \times V_e \times l \times t}$$

Dónde:

Abs-BC = absorbancia corregida para el blanco a 410 nm.

V<sub>f</sub> = Volumen final del ensayo (μL).

V<sub>e</sub> = Volumen de enzima utilizado en el ensayo (μL).

FD = factor de dilución de la enzima previa al ensayo.

ε = coeficiente de extinción molar del nitrofenol a 410 nm (15200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

l = paso de luz. En el ensayo en microtubo viene dado por la anchura de la cubeta (1 cm).

t = tiempo de ensayo en (min).

Para expresar la actividad específica (U/g) se dividió por la concentración de proteína de la muestra.

### 3.2.2 Determinación de concentración de proteína

#### 3.2.2.1 Determinación de concentración de proteína en muestras purificadas

La determinación de la concentración de proteína de las distintas muestras purificadas se llevó a cabo mediante Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™). Para ello se diluyeron las muestras en agua destilada hasta un rango comprendido entre 0,2 y 0,8 g/L de contenido de proteína para operar en el rango lineal del ensayo. A 50 μL de la dilución se añadieron 950 μL de reactivo BCA (preparado según instrucciones del fabricante) y se incubó a 37°C durante 30 min en un termobloque “Eppendorf” modelo “Thermomixer Comfort”. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro marca “Thermo Scientific” modelo “Genesys 6”. Para el blanco se procedió de la misma manera sustituyendo la muestra por agua. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Para el cálculo del valor de concentración de proteína se utilizó una regresión a partir de un patrón de Gamma Globulina liofilizada (Bio-Rad, Ref. 500-0005) siguiendo las instrucciones del proveedor.

### 3.2.2.2 Determinación de concentración de proteína en cócteles enzimáticos

Para la determinación de la concentración de proteína en cócteles enzimáticos en primer lugar se aplicó Compat-Able™ Protein Assay Preparation Reagent Kit (Thermo Scientific™) para eliminar sales, detergentes, agentes reductores o cualquier tipo de impureza de la muestra que pueda hacer interferencia con el ensayo.

Se diluyeron las muestras en agua destilada hasta un rango comprendido entre 0,2 y 0,8 g/L de contenido de proteína para operar en el rango lineal del ensayo y se tomaron 50 µL de estas diluciones a las que se añadió 500 µL del reactivo 1. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente se añadió el reactivo 2 y se centrifugó a 12000 x g durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante por aspiración usando una bomba de vacío y se resuspendió la pella en 50 µL de agua destilada.

Una vez completado este protocolo se procedió a aplicar Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™) como se describe en el apartado 3.2.1.

### 3.2.3 Purificación de las principales celulasas de *Myceliophthora thermophila* C1

#### 3.2.3.1 Clarificación

Para la purificación de las distintas enzimas del cóctel secretado por *M. thermophila* C1 se partió de un caldo de fermentación con una concentración de proteína de 92 g/L. En primer lugar se llevó a cabo una clarificación consistente en una centrifugación a 16000 rpm (27760 x g) durante 40 min a 4°C (Compact High Speed Refrigerated Centrifugate 6500 con rotor AG-506R, Kubota), una filtración mediante filtros de nylon de 0,45 µm (VWR) y una dilución al 30% v/v con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,0.

#### 3.2.3.2 Primer paso de purificación de las principales celulasas

Tras la clarificación, 200 mL de muestra clarificada fueron aplicados a una columna de intercambio aniónico, Q-Sepharose Fast Flow High Scale-HS (GE Healthcare), equilibrada con 6 volúmenes de columna de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,0 a una velocidad de flujo de 6 mL/min. Las proteínas unidas según su carga neta fueron eluidas mediante gradiente 0-1 M NaCl con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,0 y un a una velocidad de flujo de 10 mL/min.

### 3.2.3.3 Purificación $\beta$ -glucosidasa 1 (Bgl1)

Para la purificación de la enzima Bgl1 del caldo secretado por *M. thermophila* C1, las fracciones resultantes del primer paso de purificación de las principales celulasas se ensayaron para la actividad BGL con el sustrato pNGP y se analizó el perfil proteico mediante gel SDS-PAGE. Se escogieron las fracciones que concentraban la actividad BGL, se juntaron y acondicionaron con sulfato amónico 1 M para la posterior cromatografía de interacción hidrofóbica en una columna HiLoad 26/10 Phenyl-Sepharose High Performance (GE Healthcare), equilibrada con 6 volúmenes de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,0 con 1 M de sulfato amónico a una velocidad de flujo de 6 mL/min. La proteína unida se eluyó en un gradiente de 1-0 M de sulfato amónico con tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,0 a una velocidad de 6 mL/min. Se obtuvieron fracciones con alta pureza eletroforética de la enzima Bgl1 que se juntaron y aplicaron a una columna de desalado HiPrep 26/10 Desalting (GE Healthcare), equilibrada con 5 volúmenes de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,0 a una velocidad de flujo de 8 mL/min. La muestra final se concentró con centricones de 50 kDa (Vivaspin 20, Sartorius) y posteriormente se determinó la concentración de proteínas y las actividades celulolíticas principales. Finalmente la muestra se identificó por huella péptida por el Servicio de Análisis de Proteínas del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Sevilla).

### 3.2.3.4 Celobiohidrolasa 1 (Cbh1a)

La purificación de la enzima Cbh1 del cóctel enzimático secretado por *M. thermophila* C1 se inició a partir de las fracciones procedentes del primer paso cromatográfico de intercambio aniónico de la purificación de las principales celulasas. Las fracciones fueron ensayadas para actividad CBH sobre Avicel y se analizó el perfil proteico mediante gel SDS-PAGE. Las fracciones que se escogieron para el siguiente paso de purificación tenían altos niveles de actividad celobiohidrolasa y un perfil proteico donde se incluía la enzima Cbh1 de forma mayoritaria. Éstas se juntaron y acondicionaron con sulfato amónico 1 M para posteriormente aplicarlas en una columna de interacción hidrofóbica, HiLoad 26/10 Phenyl-Sepharose High Performance (GE Healthcare), equilibrada con 6 volúmenes de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,0 con 1 M de sulfato amónico a una velocidad de flujo de 6 mL/min. La proteína unida se eluyó en un gradiente de 1-0 M de sulfato amónico con tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,0 y, a una velocidad de flujo de 6 mL/min generando una serie de fracciones separadas en base a su interacción con los grupos hidrofóbico de la resina de la columna.

Las fracciones obtenidas de la segunda etapa de purificación tenían actividad y perfil proteico similares en el que se encuentra la enzima Cbh1 con un alto grado de

pureza electroforética. Estas fracciones se unieron y aplicaron en una columna HiPrep 26/10 Desalting (GE Healthcare) equilibrada con 5 volúmenes de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,0 a un flujo de 8 mL/min, para eliminar las sales que contiene la muestra. La muestra final se concentró con centricones de 30 kDa (Vivaspin 20, Sartorius) y posteriormente se determinó la concentración de proteínas y las actividades celulolíticas principales. Finalmente la muestra se identificó por huella péptida por el Servicio de Análisis de Proteínas del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Sevilla).

#### 3.2.3.5 Celobiohidrolasa 4 (CbhIIb)

La purificación de la enzima Cbh4 del caldo secretado por *M. thermophila* C1 partió de la cromatografía de intercambio aniónico del primer paso de purificación de las celulasas principales (Apartado 3.2.3.2). Descartando aquellas fracciones donde se conocía que se encontraba la enzima Cbh1, se analizaron las fracciones resultantes mediante ensayo de actividad CBH sobre Avicel y SDS-PAGE. La actividad mayoritaria se encontró en las fracciones no retenidas por la columna, compuesta por aquellas proteínas que se encuentran cargadas positivamente de manera que no son retenidas por la columna. Las fracciones escogidas se unieron, se acondicionaron con sulfato amónico 1 M y se aplicaron a una columna de interacción hidrofóbica, HiLoad 26/10 Phenyl-Sepharose High Performance (GE Healthcare), equilibrada con 6 volúmenes de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,0 con 1 M de sulfato amónico a una velocidad de flujo de 6 mL/min. La proteína unida se eluyó en un gradiente de 1-0 M de sulfato amónico con tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,0 a una velocidad de flujo de 6 mL/min.

Se monitorizó la purificación analizando las fracciones resultantes mediante ensayo de actividad CBH con Avicel como sustrato y gel SDS-PAGE. De esta segunda etapa de purificación se obtuvieron fracciones enriquecidas en la enzima Cbh4 que, se juntaron y aplicaron en tres rondas consecutivas a una columna de exclusión molecular HiLoad 16/600 Superdex 75 pg previamente equilibrada con 8 volúmenes de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,0. Las proteínas se eluyeron a una velocidad de flujo 0,4 mL/min con tampón de equilibrado.

Tras analizar la muestra por ensayo de actividad CBH con Avicel como sustrato y gel SDS-PAGE las fracciones que contenían la enzima Cbh4 pura, se unieron y se concentraron con centricones de 30 kDa (Vivaspin 20, Sartorius) para posteriormente determinar la concentración de proteína y las actividades celulolíticas principales. Finalmente la muestra se identificó por huella péptida por el Servicio de Análisis de Proteínas del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Sevilla).



### 3.2.3.6 Endoglucanasa 2

Para comenzar la purificación de Eg2 del caldo enzimático secretado por *M. thermophila* se parte del fraccionamiento inicial mediante cromatografía de intercambio aniónico (Apartado 3.2.3.2). Las fracciones se ensayaron en busca de actividad EG con sustrato Azo-CMC y se observó el perfil proteico mediante SDS-PAGE. El pico de actividad EG se encontró en las primeras fracciones de la zona no retenida de la columna de intercambio iónico. El siguiente paso de purificación y fue llevado a cabo mediante una cromatografía de interacción hidrofóbica. Para ello se acondicionaron las muestras con sulfato amónico 1M y se aplicaron a una columna HiLoad 26/10 Phenyl-Sepharose High Performance (GE Healthcare), equilibrada con 6 volúmenes de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,0 con 1 M de sulfato amónico a una velocidad de flujo de 6 mL/min. La proteína unida se eluyó en un gradiente de 1-0 M de sulfato amónico con tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,0 a una velocidad de flujo de 6 mL/min.

El pico correspondiente a las fracciones que concentraron la actividad EG mostraron en el gel una proteína con el tamaño de Eg2 (45 kDa). Estas fracciones se unieron, se concentraron y se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular en cinco rondas consecutivas mediante el uso de una columna HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, previamente equilibrada con 8 volúmenes de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,0. Las proteínas se eluyeron a una velocidad de flujo 0,5 mL/min con tampón de equilibrado.

La purificación se siguió mediante ensayo de actividad con sustrato Azo-CMC a la vez que se analizó el perfil proteico mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían la enzima Eg2 electroforéticamente pura se concentraron con centricones de 10 kDa (Vivaspin 20, Sartorius) para posteriormente determinar la concentración de proteína y las actividades celulolíticas principales. Finalmente la muestra se identificó por huella péptida por el Servicio de Análisis de Proteínas del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Sevilla).

## 3.2.4 Electroforesis de proteínas

### 3.2.4.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realizó en geles de poliacrilamida 7,5% o 12% MiniProtean (4561023 y 4561043 BioRad) en presencia de SDS (250 mM Tris-HCl, 930 mM glicina, SDS 1%). Un total de 20 µg de muestra se mezclaron con tampón de carga 4X (0,5 M Tris-HCl pH 6.8, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 20% v/v, azul de bromofenol 0,02%) y se hirvió durante 5 min para la

completa desnaturalización de las proteínas. Se cargaron 5  $\mu$ L de marcador Broad-Range SDS-PAGE Standards (1610317 Biorad) mezclados con 5  $\mu$ L del tampón de carga. La electroforesis se llevó a cabo en el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (1658004 Biorad) con un amperaje de 20 mA por gel durante aproximadamente 50 minutos a temperatura ambiente. Tras la migración, la tinción se realizó sumergiendo el gel en una disolución de Coomassie Brilliant Blue 1%, etanol 20% y ácido acético glacial 10% durante 30 minutos en agitación suave. Para desteñir se utilizó una solución de decoloración con etanol 20% y ácido acético glacial 10% durante aproximadamente 2 horas hasta la completa visualización de las bandas.

#### 3.2.4.2 Electroforesis bidimensional de proteínas

Se llevó a cabo una electroforesis bidimensional de proteínas (2D) de las proteínas purificadas. Para ellos se escogió como primera dimensión un isoelectroenfoco donde las proteínas se separaron según su punto isoeléctrico, para a continuación llevar a cabo una segunda dimensión mediante una electroforesis en gel de poliácridamida para separar dichas proteínas según su peso molecular.

- Primera dimensión: Isoelectroenfoco (IEF)

Con el objetivo de limpiar de impurezas, así como reducir el contenido en sales que pudiera afectar al IEF, las muestras se dializaron con tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,0 y se concentraron con centricones de 10 kDa (Vivaspin 20, Sartorius). En el caso de las proteínas puras se cargaron 5  $\mu$ g de proteína a 125  $\mu$ L de tampón de rehidratación (Urea 8M, DTT 7,7 g/L, CHAPS 40 g/L, anfolitos BioLyte 3/10 100x, azul de bromofenol 0,002%). La mezcla se aplicó en una de las calles del sistema PROTEAN I12 IEF donde se colocó a continuación una tira ReadyStrip de IPG de 7cm con pH 3-10 (1632000, Biorad). Para evitar la evaporación se añadieron 4 mL de aceite mineral.

El tamaño de poro de la acrilamida en la tira de IPG es muy pequeño en las fases tempranas de la rehidratación, lo que disminuye la eficiencia de la absorción de las proteínas de mayor peso molecular. Debido a que las muestras que aplicamos tienen proteínas de un tamaño comprendido entre los 45 y 100 kDa se optó por llevar a cabo una rehidratación de la tira activa, pasando un voltaje suave de 50 V durante 12h a temperatura ambiente, lo que favorece la absorción de las proteínas de mayor peso molecular. A continuación se comenzó el IEF donde se escogió el protocolo 7 cm pH 3–10 G detallado en la Tabla 3.2 por ser el protocolo optimizado por el fabricante para la entrada de la muestra en la tira.

**Tabla 3.2** Protocolo de IEF para la electroforesis bidimensional de proteínas

Paso	Voltaje (V)	Rampa	Tiempo	Unidades
1	250	Rápida	0:20	H:min
2	4000	Gradual	1:00	H:min
3	4000	Rápida	15000	Vh
4	500		$\infty$	

- Equilibrado de tiras

Una vez transcurrido el IEF se procedió al equilibrado de las tiras de IPG para lo cual se colocó la tira en el soporte para tal fin de Biorad y se sumergió dicha tira en 2,5 mL de la solución de equilibrado I (Urea 6M, SDS 0,4%, Glicerol 20%, Tris HCl 250mM pH 8,8, DTT 20 g/L) durante 10 minutos, para reducir y alquilar todos los puentes de disulfuro que pudieran quedar oxidados. A continuación se descartó la solución de equilibrado I y se sumergió la tira en 2,5 mL de solución de equilibrado II (urea 6M, SDS 0,4%, glicerol 20% v/v, Tris HCl 250mM pH 8,8, iodoacetamida 25 g/L) durante 10 minutos para sustituir los detergentes no iónicos para preparar la segunda dimensión. Por último se realizó un lavado de la tira en tampón de corrida con SDS durante 10 minutos.

- Segunda dimensión: Electroforesis en poliacrilamida según peso molecular en condiciones desnaturizantes

La segunda dimensión se llevó a cabo tras el equilibrado de las tiras utilizando geles de acrilamida Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels for 2-D Electrophoresis (Biorad). Se cargaron 8  $\mu$ L de marcador Broad-Range SDS-PAGE Standards aplicados en un papel de filtro Whatman e insertado en el pocillo. Para sellar el pocillo se utilizó una solución de agarosa al 0,8% con azul de bromofenol para visualizar el frente. Se aplicó un amperaje de 20 mA por gel durante aproximadamente 50 minutos a temperatura ambiente. La tinción se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 3.2.4.1.

### 3.2.4.3 Zimogramas

Para localizar la actividad  $\beta$ -xilosidasa de los sobrenadantes de *M. thermophila* C1 transformado con *bxl 201.7* en geles de electroforesis se llevó a cabo un zimograma con metil umberiferil-  $\beta$ -D-xilopiranosido (MUX, M7008 Sigma Aldrich).

Se mezclaron 15  $\mu$ L de sobrenadante con 5 de  $\mu$ L tampón de carga 4X (0.5 M Tris-HCl pH 6.8,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 20% v/v, azul de bromofenol 0,02%). Se cargó la mezcla en un gel de poliacrilamida 12% MiniProtean (BioRad). La

electroforesis se llevó a cabo en el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell aplicando un amperaje constante de 20 mA durante aproximadamente 50 min a temperatura ambiente. Tras la migración, el gel se incubó con Triton X-100 al 2,5% v/v durante 30 min en agitación suave para renaturalizar las proteínas. A continuación se incubó en tampón de ensayo acetato sódico 100 mM pH 5,0 durante 5 min. Por último el gel se incubó con MUX 100  $\mu$ M diluido en acetato sódico 100 mM pH 5,0 durante 5 min. El gel se visualizó en el Gel Doc™ XR+ System.

### 3.2.5 Caracterización cinética de las enzimas purificadas

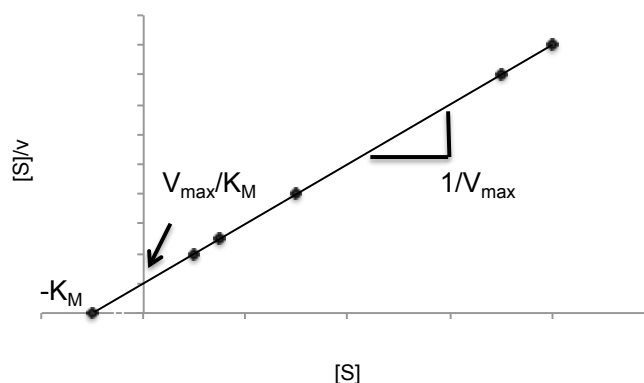
#### 3.2.5.1 Cálculo de las constantes cinéticas

Las constantes cinéticas para cada una de las enzimas purificadas, Bgl1, Cbh1 y Cbh4, se determinaron mediante el ensayo de actividad descrito para cada una de ellas.

- Para la enzima Bgl1 con sustrato análogo se ensayó en un rango de concentración de sustrato pNGP de 0 a 2 mM, con intervalos de 0,33 mM. Cuando se utilizó celobiosa como sustrato se ensayó en un rango de concentraciones de 0 a 3 mM con intervalos de 0,3 mM y de 4,3 a 5,8 mM.
- Para las enzimas Cbh1 y Cbh4 se ensayó en un rango de concentraciones de Avicel PH-101 de 0 a 10 g/L con intervalos de 2 g/L y de 20 a 100 g/L con intervalos de 20 g/L. Adicionalmente la enzima Cbh1 se ensayó con sustrato análogo pNCB en un rango de concentraciones de 0 a 2 mM en intervalos de 0,2 mM y una última concentración a 3,2 mM.

El cálculo de la  $K_m$  y  $V_{max}$  se realizó mediante el diagrama de Hanes-Woolf ( $S/v$  vs.  $S$ ) donde  $S$  es el sustrato y  $v$  la velocidad (Figura 3.2). En la ecuación obtenida con esta representación el valor de  $V_{max}$  es la inversa de la pendiente. El punto de corte con el eje  $x$  daría el valor de la  $K_m$ .

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_{max}} [S] + \frac{K_m}{V_{max}}$$



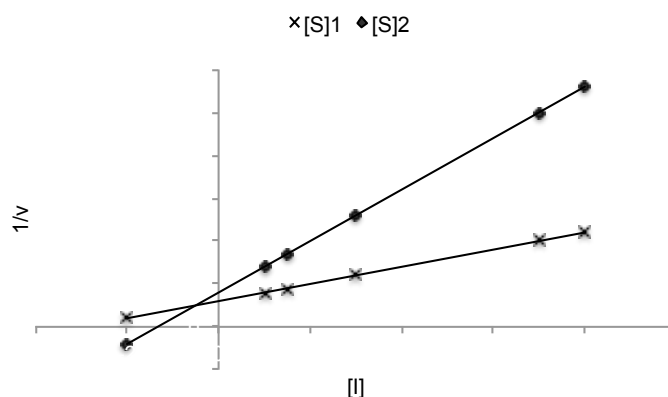
**Figura 3.2** Representación secundaria de Hanes-Woolf para el cálculo de las constantes cinéticas.

### 3.2.5.2 Cálculo de las constantes de inhibición

Para la determinación de las constantes de inhibición de la enzima Bgl1 por glucosa se midió la actividad en presencia de concentraciones crecientes de glucosa. En la determinación con pNGP como sustrato se eligieron unas concentraciones de 0,66 mM (S1) y 2,66 mM (S2) y un rango de inhibidor de 0 a 33 mM. Cuando se utilizó celobiosa como sustrato se optó por unas concentraciones de 0,6 mM (S1) y 2,3 mM (S2) y un rango de inhibidor de 0 a 4,4 mM.

Para la determinación de la constante de inhibición de las enzimas Cbh1 y Cbh4 para glucosa y celobiosa con Avicel PH-101 como sustrato se midió la actividad celobiohidrolasa en presencia de concentraciones crecientes de los dos inhibidores. En todos los casos las concentraciones de sustrato Avicel PH-101 fueron de 40 g/L (S1) y 80 g/L (S2). Para la inhibición por glucosa se llevó a cabo el ensayo en un rango de concentración de inhibidor de 0 a 55 mM. Para la inhibición por celobiosa el rango de concentración de inhibidor escogido fue de 0 a 5,5 mM. En el caso de utilizar el sustrato análogo pNCB se eligieron las concentraciones 0,85 mM como S1 y 1,7 mM como S2. Para la inhibición por celobiosa se utilizó un rango de 0 a 2,9 mM, mientras que para la inhibición por glucosa se alcanzaron valores de 55 mM.

El cálculo de las constantes inhibitorias se realizó mediante el diagrama de Dixon-Webb ( $1/v$  vs.  $I$ ) donde  $v$  es la velocidad e  $I$  es la concentración del inhibidor a dos concentraciones distintas de sustrato, S1 y S2 (Figura 3.3). La constante de inhibición,  $K_i$ , se calculó del corte de ambas rectas donde  $K_i = -I$ .



**Figura 3.3** Representación secundaria de Dixon para el cálculo de las constantes inhibitorias.

Para determinación del porcentaje de inhibición de la enzima Eg2 con glucosa y celobiosa como inhibidores se llevó a cabo el ensayo de actividad estándar con sustrato Azo-CMC con concentraciones crecientes de inhibidor, de 0 a 555 mM de glucosa y de 0 a 83 mM de celobiosa.

### 3.2.6 Termorresistencia, termoestabilidad y temperatura óptima

Para determinar la termorresistencia de las enzimas en condiciones de proceso de hidrólisis, la muestra se diluyó dos veces en tampón acetato sódico 200 mM pH 5,0 y se incubó durante 72 horas a 50°C y 150 rpm en un incubador orbital Multitron II. Se determinó la actividad a tiempo inicial y cada 24 horas.

La termoestabilidad fue medida tras la incubación en acetato sódico 200 mM pH 5,0 durante 10 min a cada temperatura desde temperatura ambiente hasta 80°C con intervalos de 5°C. Tras enfriar la muestra en hielo se realizó el ensayo de actividad estándar de cada enzima. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) se definió como la temperatura a la que la enzima conserva el 50% de su actividad.

La temperatura óptima de la enzima fue determinada llevando a cabo el ensayo de actividad estándar de cada enzima en un rango de temperatura de 40°C a 65°C con intervalos de 5°C.

### 3.2.7 pH óptimo

El pH óptimo de las distintas enzimas se determinó llevando a cabo el ensayo de actividad correspondiente en un rango de pH de 4,0 a 9,0. Para los pHs 4,0 a 5,5 se utilizó tampón acetato sódico 200 mM. Para los pHs 6,0 a 9,0 se utilizó tampón fosfato sódico 100 mM.

### 3.2.8 Hidrólisis enzimática de biomasa

El material PCS se neutralizó con NaOH 2M hasta un pH final de 5,5 y se liofilizó durante 48h en un liofilizador LyoQuest (TelStart). Tras este tiempo la biomasa se molió con un tamaño de molienda de 200  $\mu$ m. Los sólidos totales de la biomasa se analizaron mediante una balanza de humedad (Sartorius MA35) siendo aptos para su uso por encima de 92% de sólidos totales.

La hidrólisis se realizó con una cantidad de 3 g de masa total en tubos de polipropileno de cierre hermético de 10 mL. Las condiciones de las hidrólisis fueron: 20% de sólidos totales, a 50°C, durante 72 horas y con una agitación de 250 rpm en un incubador orbital Multitron II.

Las celulasas principales utilizadas fueron aquellas previamente purificadas del cóctel de fermentación industrial de *M. thermophila* C1 incluyendo las enzimas endoglucasa II (Eg2), celobiohidrolasa I (Cbh1), celobiohidrolasa IV (Cbh4) y  $\beta$ -glucosida I (Bgl1). Las enzimas polisacarido monooxigenasa (PMO-04725, PMO-06230, PMO-01470 y PMO-09768) fueron facilitadas por el laboratorio de bioquímica de Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías. La dosificación se llevó a cabo en miligramos de proteína por gramo de glucano del PCS. La dosificación de cada uno de los experimentos se indica en los resultados. Como control se incluyó el cóctel enzimático secretado por *M. thermophila* C1. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

### 3.2.8.1 Análisis de muestras de hidrólisis de biomasa

#### 3.2.8.1.1 Determinación de la concentración de azúcares

Una vez finalizada la hidrólisis se tomó muestra para analizar el contenido de azúcares. Para ello se diluyeron las muestras cinco veces p/p con fase móvil (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,7%, azida sódica 0,065%), anotando el peso exacto de las diluciones, se filtraron con filtros de nylon de 0,22 µm y se evaluaron mediante HPLC Agilent Technologies 1200/1260 Series con un detector RID y columna Aminex HPX-87H. La fase móvil (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,74%, azida sódica 0,065%) se corrió a un flujo de 0,6 mL/min y la columna se fijó a 60°C de temperatura. Como patrón se utilizó una recta de calibrado preparada con glucosa, celobiosa, xilosa, xilobiosa y arabinosa.

#### 3.2.8.1.2 Determinación de concentración de ácido glucónico

Para determinar la concentración de ácido glucónico presente en las muestras de PCS hidrolizado en presencia de las enzimas PMO se empleó el del kit de detección de ácido glucónico/gluconolactona (K-GATE, Megazyme). Las muestra se diluyeron 1:10 p/p en agua miliQ anotando el peso exacto de las medidas. Tras centrifugar durante 5 minutos a 12000 xg se rescató el sobrenadante y se siguieron las instrucciones del fabricante. La cantidad de ácido glucónico se determinó mediante la formación de NADPH en una reacción estequiométrica a través de la medición del incremento de absorbancia a 340 nm.

$$\text{Ácido glucónico (g/L)} = \frac{\Delta Abs \times Ve \times Pm}{\epsilon \times l \times Vs \times FD}$$

Donde,

ΔAbs = es el incremento de absorbancia medido a 340nm

Ve = volumen de ensayo (300 µL)

Pm = peso molecular del ácido glucónico (196,2 g/mol)

ε = coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm (6300 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

l = paso de luz. En el ensayo en microplaca con 300 µL de volumen corresponde a 1 cm.

Vm = volumen de muestra para el ensayo (10 µL)

FD = factor de dilución de la muestra (≈10)



### 3.2.8.2 Optimización de las proporciones de las enzimas principales de *M. thermophila* C1

Para la optimización de las proporciones de las enzimas principales del cóctel de *M. thermophila* C1 en cóctel mínimo para la hidrólisis de biomasa PCS, se diseñó un experimento variando las dosis de las distintas enzimas. Para ello se hizo uso del programa estadístico Statgraphics para el diseño de mezclas mediante el cual se estableció una variable de respuesta, glucosa, y 6 factores experimentales, dosis de las enzimas Eg2, Cbh1, Cbh4, Bgl1, PMO-04725 y PMO-06230. Partiendo de la dosis estándar que emula las concentraciones de cada una de la enzimas en el caldo extracelular, se establecieron unos límites de variación del 40% por encima y por debajo de la dosis de referencia. Se permitieron 8 valores para cada variable y se incluyeron 10 valores intermedios para la enzima Cbh1. La dosis total en todos las condiciones fue de 10,64 mg/g de glucano.

Se escogió el diseño de superficie de respuesta, ya que se utiliza para encontrar los niveles óptimos de factores experimentales. El programa arrojó un diseño experimental con 56 combinaciones de dosis con las que se llevó a cabo una hidrólisis de biomasa con PCS en condiciones estándar (dosis mostradas en la Figura 4.14).

Para el análisis de resultados con Statgraphics se escogió el modelo cúbico.

### 3.2.8.3 Hidrólisis para el estudio del efecto del dominio de unión a carbohidratos

Para estudiar el efecto del módulo de unión a carbohidratos de la Cbh1 en la hidrólisis de biomasa se llevó a cabo una cinética de liberación de glucosa durante la hidrólisis enzimática. Para tal fin las hidrólisis se realizaron en una escala de 10 g totales de masa en frascos ISO de 100 mL, para minimizar los errores producidos por la toma de muestra durante el proceso. La hidrólisis se llevó a cabo a 50°C, durante 72 horas y 150 rpm en un incubador orbital Nutritron II. Se tomó muestra cada 24h para llevar un seguimiento de la cinética de liberación de glucosa.

Las celulasas principales utilizadas fueron las purificadas previamente en este trabajo. Las enzimas purificadas PMO-06230, PMO-04725 y la isoforma de Cbh1 sin dominio de unión a carbohidratos fueron facilitadas por el laboratorio de Bioquímica de Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías.

### 3.2.9 Escrutinio de actividad $\beta$ -xilosidasa en cepas de hongos celulolíticos

Se llevó a cabo un escrutinio de actividad  $\beta$ -xilosidasa en 200 cepas de hongos celulolíticos. Para ello se inoculó cada cepa en un matraz Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de medio MM1 y se incubó durante 72 horas a 35°C y 250 rpm en un incubador orbital Multitron Pro con diámetro de órbita de 25 mm. Transcurrido este tiempo se inició la fase de producción para la que se inoculó con 2 mL de cada una de las cepas en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 40 mL de medio MM2-Lac. Se incubaron durante 10 días a 35°C y 250 rpm en el incubador orbital Multitron Pro.

Para llevar a cabo el análisis de las de las enzimas celulolíticas se centrifugaron los cultivos a 3220 x g durante 10 min para separar el caldo de cultivo del micelio. El sobrenadante se utilizó para determinación de proteína mediante el método BCA (3.2.2.1), se llevó a cabo un gel SDS-PAGE y se midió actividad beta-xilosidasa (3.2.1.6).

Con las cepas positivas se analizó las termorresistencia y el pH óptimo de la cepa. Finalmente las muestras se identificaron por huella péptida por el Servicio de Análisis de Proteínas del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Sevilla).

### 3.2.10 Amplificación, clonación y subclonación del gen *bxl* 20.17

#### 3.2.10.1 Extracción de ADN cepa 20.17.

La cepa 20.17 se inoculó en un matraz de 100 mL con 40 mL de medio MI y se incubó durante 48 horas a 35°C y 250 rpm en un incubador orbital Multitron II con órbita de 25 mm. Posteriormente se recogió el micelio por centrifugación a 3220 x g, se secó con papel filtrante y se congeló con nitrógeno líquido para triturarlo con ayuda de un mortero. A partir del polvo generado del micelio se inició la extracción del ADN genómico mediante el kit DNeasy Plant Mini Kit (69106, Qiagen) según las indicaciones del fabricante.

#### 3.2.10.2 PCR para la amplificación del gen *bxl* 20.17.

Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen *bxl* 20.17 utilizando como molde el ADN genómico extraído de la cepa. Para el diseño de los cebadores se partió de la secuencia de anotada en la base de datos utilizando el programa Generunner (<http://www.generunner.net>). Ambos oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma Aldrich.

- Cebador directo con péptido señal nativo: se incluyó una secuencia de corte NdeI (secuencia en negrita) para la posterior clonación dirigida. El cebador resultante fue:

5'**CATATG**ATTTC CAACGCAGCTCTCATCGC3'

- Cebador directo incluyendo el péptido señal de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*: se eliminó el péptido señal de esta proteína mediante el uso del software de predicción de corte SignalP. Para ello se introdujo la secuencia de aminoácidos de la proteína y el software determinó mediante tres parámetros que el sitio de corte del péptido señal se encontraba entre la posición 21 y 22. Se sustituyó por el péptido señal de la glucoamilasa de *A. niger* (secuencia subrayada) y se incluyeron 31 nucleótidos para la correcta hibridación del cebador al molde. Se incluyó una secuencia diana NdeI para la posterior clonación dirigida (secuencia en negrita). El cebador resultante fue:

5'**CATATG**TCGTTCCGATCTCTTCTCGCCCTGAGCGGCCTTGTC  
TGCTCGGGGTTGGCACAAACAACCAGACATACGCAAACACTACT  
 CCT 3'

- Cebador reverso: se incluyó una diana de corte BamHI (secuencia en negrita) para la posterior clonación dirigida. El cebador resultante fue:

5'**GGATCC**TTATGCAGAAGCCTTAATCTGCTGCTCCT3'

Para evitar errores en la amplificación del gen se utilizó una polimerasa de alta fidelidad con actividad correctora de errores que además añadiese a cada uno de los extremos una adenina para la posterior clonación. Se empleó el kit HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) que incluía en el tampón una concentración equilibrada entre KCl and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que evita optimizar la concentración de Mg<sup>2+</sup>. Se incluían también dNTPs (1μM). Para conseguir una buena separación de las cadenas de ADN se utilizó DMSO 2%. En la Tabla 3.3 se resumen las cantidades utilizadas de cada componente y en la Tabla 3.4 el protocolo de la PCR para la amplificación del gen *bxl* 20.17.

**Tabla 3.3** Protocolo de la PCR para la amplificación del gen *bxl* 20.17

	Volumen (μL)
ADN (50 ng/μL)	1
Cebador directo (10μM)	5
Cebador reverso (10μM)	5
Tampón 5x	10
Polimerasa (5 U/μL)	0,5
DMSO	1
Agua	27,5
Volumen final	50

**Tabla 3.4** Protocolo de la PCR para la amplificación del gen *bxl 20.17*

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min:s)</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	5:00	1
<b>Desnaturalización</b>	94	0:30	x34
<b>Alineamiento</b>	57	1:00	
<b>Extensión</b>	72	2:30	
<b>Elongamiento final</b>	72	15:00	1
<b>Mantenimiento</b>	4	∞	1

### 3.2.10.3 Electroforesis de ADN en gel de agarosa.

El análisis del producto de la PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con 0,005% de SYBR Safe DNA Gel Stain (ThermoFisher) en tampón TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM, pH 8). Para ello se mezcló con tampón de carga 6x (NEB) y se cargó en el gel. Como marcador se incluyó el 1kb DNA Ladder (Promega). Se utilizó un voltaje constante de 100V durante 40 minutos tras lo cual se visualizó y fotografió en el transiluminador Gel Doc™ XR con el software ImagenLab (Bio-rad).

### 3.2.10.4 Purificación del fragmento amplificado

La banda del fragmento amplificado se recortó del y el ADN se purificó mediante en kit QIAquick Gel Extraction (28706, Qiagen) según recomendaciones del fabricante. Un microlitro del fragmento purificado se corrió en gel de agarosa para comprobar la purificación.

### 3.2.10.5 Ligación en pMBL-T

El producto de la PCR purificado contaba con dos adeninas en los extremos que sirven para la ligación en el vector de clonación comercial pMBL-T (C0030, Canvax), ya que este vector posee dos timinas en sus extremos. La ligación se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante utilizando un ratio 5:1 inserto:vector. Tras el tiempo de incubación se transformó en células competentes *E.coli* DH5α High

eficiency (NEB) según indicaciones de la casa comercial. Se sembraron en placas de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina, 40 µg/mL de X-gal y 0,1 mM IPTG para la selección y se incubaron a 37°C O/N. Tras la incubación gracias al método de selección LacZ se escogieron 4 colonias blancas que debían haber incorporado el gen *bxl* 20.17. Para la comprobación se llevó a cabo un PCR de colonias en las mismas condiciones que la PCR de amplificación del gen *bxl* 20.17. Además se iniciaron inóculos para miniprep en un volumen de 2,5 mL de LB con 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C y 250 rpm O/N.

#### 3.2.10.6 Análisis de restricción

Tras llevar a cabo la extracción del plásmido de los cultivos incubados mediante lisis alcalina con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) según las indicaciones del fabricante, se realizó un análisis de restricción para confirmar la inserción del fragmento en el vector. Para ello se utilizaron 2 µL de cada uno de los plásmidos y se llevó a cabo una digestión con 20 U de NdeI (NEB) y 20 U de BamHI (NEB) en tampón CutSmart en un volumen final de 20 µL durante 30 min a 37°C. El producto de la digestión se cargo en un gel de agarosa en las mismas condiciones previamente descritas (3.2.10.3).

El plásmido se utilizó para secuenciar el fragmento insertado por la unidad de genómica y síntesis de ADN del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López – Neyra" (Granada).

#### 3.2.10.7 Subclonación en vector de expresión de *M. thermophila* C1

Se escogió por un lado uno de los clones positivos de la construcción pMBL-T::*bxl* 20.17, confirmados tanto por PCR de colonias como por restricción, y por otro lado se usó el vector pBase5K-4 para llevar a cabo una doble digestión independiente. En el caso de la construcción pMBL-T::*bxl* 20.17 se usaron 25 µL y el caso del vector pBase5K-4 20µg, y en ambos casos se utilizaron 40 U de NdeI (NEB) y 40 U de BamHI-HF (NEB) en tampón CutSmart en un volumen final de 50 µL durante 2h a 37°C.

Tras comprobar el final de la digestión al analizar las reacciones por electroforesis en gel de agarosa, se procedió a recortar las bandas correspondientes al fragmento *bxl* 20.17 y del vector pBase5K-4 digerido y a su purificación mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las indicaciones del fabricante.

Una vez purificados vector e inserto se realizó la ligación por duplicado con 1 U de ligasa T4 (Roche) con ratio 1:5 y 1:7 vector:inserto en 10 µL de volumen final a 4°C

O/N. Para llevar un control de religación se puso una ligación en las mismas condiciones sin inserto. La ligación se transformó en células competentes *E. Coli* DH5 $\alpha$  High efficiency (NEB) según indicaciones de la casa comercial, se sembró en placas de medio LB con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina y se incubó a 37°C durante la noche.

Se escogieron 4 colonias al azar de la construcción pBase5-K4::*bxl* 20.17 para comprobar por PCR de colonias con las mismas condiciones que la amplificación del gen *bxl* 20.17. A su vez, estas colonias se crecieron en 2,5 mL de LB con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina a 37°C a 250 rpm O/N para llevar a cabo la extracción del plásmido con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Una vez purificado se llevó a cabo un análisis de restricción en las mismas condiciones que la comprobación por restricción de la construcción pMBL-T::*bxl* 20.17.

El clon 1 se seleccionó para secuenciar y transformar en *M. thermophila* C1.

### 3.2.11 Transformación del gen *bxl* 20.17 en *M. thermophila* C1

La transformación del hongo *M. thermophila* se llevó a cabo mediante la fusión de protoplastos siguiendo el protocolo descrito en la patente de Dyadic (Emalfarb y col., 2006). Este procedimiento se basa en la generación de protoplastos mediante la incubación del micelio con una solución de enzimas líticas para la correcta degradación de la pared celular y la liberación de protoplastos para su posterior transformación con el ADN correspondiente.

### 3.2.12 Fermentación a escala microplaca

La fermentación de los clones de *M. thermophila* C1 transformados con el gen *bxl* 20.17 se llevó a cabo según lo descrito en la patente Emalfarb y col., 2014.

#### 3.2.12.1 Fase de crecimiento:

En placas multipocillo de 96 pocillos, que contenían 220  $\mu$ L de medio MP1, se inocularon los transformantes de *M. thermophila* C1 provenientes de la transformación con *bxl* 20.17 arrastrando parte de las colonias formadas en cada uno de los pocillos. Para el control sin transformar, auxótrofo para la síntesis de uridina, se utilizó medio MP1 ura/uri. La microplaca se envolvió en papel film introduciéndola a continuación en una bolsa de plástico cerrada para evitar la evaporación y se incubó a 35°C y 800 rpm durante 72h en un incubador orbital Multitron Pro con adaptador para microplacas y un diámetro de 3 mm.

#### 3.2.12.2 Fase de producción:

Transcurrido el tiempo de crecimiento, se inoculó con 5  $\mu$ L de cada uno de los pocillos de la fase de crecimiento en placas multipocillo de 96 pocillos, que contenían 220  $\mu$ L de medio MP2. Para el control sin transformar, auxótrofo para la síntesis de uridina, se utilizó medio MP2 ura/uri. Se incubó a 35 °C y 800 rpm durante 96 horas en un incubador orbital Multitron Pro con adaptador para microplacas y un diámetro de 3 mm..

Se transfirieron también 5  $\mu$ L de la placa de crecimiento a placas de medio sólido MS y se incubaron a 35°C durante una semana para conservar una réplica de las colonias.

Tras la incubación para el análisis de la fermentación en microplaca se centrifugaron las placas a 2900 x g en una centrifuga Eppendorf 5810 R durante 10 minutos para separar el sobrenadante del micelio. Este sobrenadante fue utilizado para la actividad enzimática y los zimogramas.

#### 3.2.13 Fermentación en matraz

La fermentación en matraz de los clones de *M. thermophila* C1 transformados con *bxI* 20.17 se llevó a cabo en dos etapas con modificaciones del protocolo establecido en la patente Emalfarb y col., 2006.

##### 3.2.13.1 Preinóculo

Se inocularon 2 matraces Erlenmeyer de 100 mL por clon desde las placas réplica de colonias transformadas de *Myceliophthora thermophila* C1, que contenían 20 mL de medio de crecimiento MM1. Para el control sin transformar auxotrofo para la síntesis de uridina, el medio se suplementó con uracilo y uridina. Se incubó durante 48 h a 35° C y 250 rpm con órbita de 25 mm de diámetro en un incubador orbital Multitron II.

##### 3.2.13.2 Producción

De cada uno de los clones se seleccionó el de mejor crecimiento en preinoculo y con él se inocularon 2 matraces Erlenmeyer de 250 mL por clon que contenían 20 mL de medio de producción MM2-Lac con 1 mL de los preinóculos (5 % de inóculo). Para el

control sin transformar el medio utilizado fue MM2-Lac Ura/Uri. Se incubó a 35° C y 250 rpm con órbita de 25 mm de diámetro en un incubador orbital Multitron II, durante 5 días.

#### 3.2.13.3 Análisis de fermentación en matraz

Se centrifugaron las muestras 10 min a 3220 x g para eliminar el micelio y se tomó el sobrenadante para determinar concentración de proteína, SDS-PAGE y actividad BXL según protocolo. Se utilizó este sobrenadante también para determinar la capacidad de sacarificación de los cultivos sobre la biomasa.



## **4 RESULTADOS**

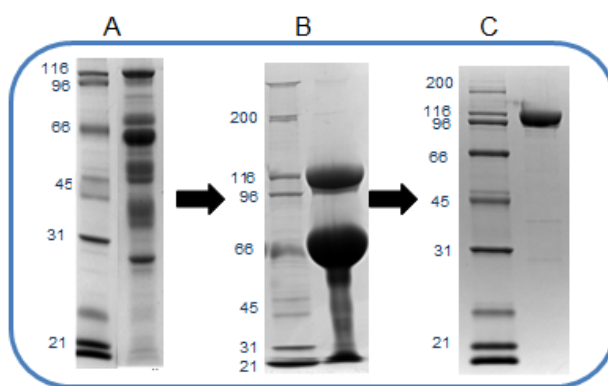


#### 4.1 Purificación y caracterización de la enzima $\beta$ -glucosidasa 1 de *Myceliophthora thermophila* C1

La enzima  $\beta$ -glucosidasa 1 (Bgl1), perteneciente a la familia GH3, cataliza la hidrólisis del enlace  $\beta$ -1,4 de un residuo terminal  $\beta$ -D-glucósido no reductor, liberando una molécula de  $\beta$ -D-glucosa. Su actividad es, por tanto, la última participante en la degradación de la celulosa a monómeros de glucosa. La cepa industrial de *M. thermophila* C1 secreta al medio de cultivo un cóctel enzimático donde la enzima Bgl1 supone aproximadamente un 10% del conjunto total de las proteínas secretadas.

##### 4.1.1 Purificación de la enzima Bgl1

Para la purificación de la enzima Bgl1 de *M. thermophila* C1 se partió de un caldo de fermentación en bioreactor de 30 L con una concentración de proteína de 92 g/L y una actividad  $\beta$ -glucosidasa (BGL) de 9 U/mg frente a p-nitrofenil glucopiranosido (pNGP). Para llevar a cabo la cromatografía de intercambio iónico la muestra se aplicó a una columna Q-sefarosa, tras la cual se analizaron las fracciones resultantes por perfil proteico y en búsqueda de actividad BGL. Se escogieron las fracciones activas y se resolvieron en una segunda etapa de purificación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (Fenil sefarosa). En esta segunda etapa se obtuvieron fracciones con un alto grado de pureza electroforética, por lo que se concentraron para su posterior caracterización (Figura 4.1). En la tabla 4.1 se resume el proceso de purificación de esta enzima. Se obtuvo una proteína con una actividad frente a pNGP de 82 U/mg, con un rendimiento del 24% y un factor de purificación de 8,8.



**Figura 4.1** Purificación de la enzima Bgl1. (A) Cóctel extracelular de *M. thermophila* C1 (B) Muestra enriquecida en Bgl1 tras la cromatografía de intercambio iónico. (C) Muestra purificada de Bgl1 tras la cromatografía de interacción hidrofóbica. Geles A y C SDS-PAGE 12%. Gel B SDS-PAGE 7,5%. En todos los casos el carril izquierdo muestra el marcador de peso molecular.

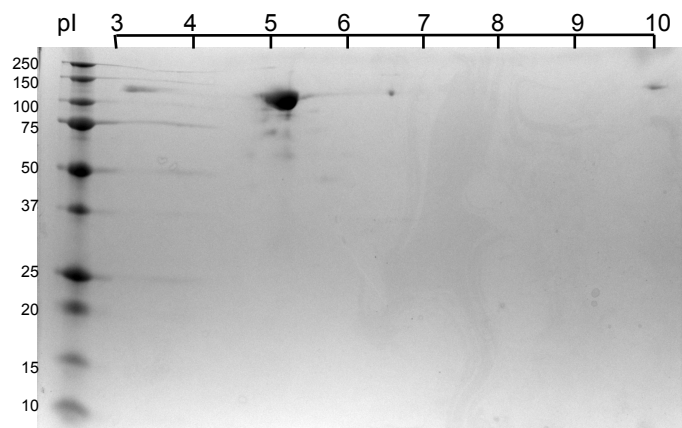
**Tabla 4.1** Rendimiento y factor de purificación de Bgl1 a partir del caldo extracelular de *M. thermophila* C1

Etapas	Proteína (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Caldo crudo	11040	103440	9	100	1
Intercambio iónico (Q-sefarosa)	5493	63385	12	61	1,2
Interacción hidrofóbica (Fenil sefarosa)	303	24846	82	24	8,8

La actividad BGL se ensayó usando pNGP.

Una vez aisladas las fracciones donde se encontraba la proteína Bgl1 se confirmó la identificación por huella peptídica mediante el uso de MALDI –TOF/TOF.

Se realizó una electroforesis bidimensional de la enzima purificada Bgl1 (Figura 4.2). Se observaron diferentes puntos en el gel, correspondientes a las distintas isoformas de la proteína, sin embargo predomina un punto que corresponde a la isoforma más abundante de la enzima Bgl1. Dicha isoforma tiene un punto isoeléctrico en torno a 5,3, que difiere levemente del punto isoeléctrico teórico predicho en 5,1. El peso molecular determinado experimentalmente es de 110 kDa, frente al teórico de 95 kDa, siendo probablemente las modificaciones postraduccionales responsables del aumento de tamaño aparente. En la tabla 4.2 se incluyen los valores de peso molecular y punto isoeléctrico tanto teóricos como experimentales.

**Figura 4.2** Electroforesis bidimensional de la enzima Bgl1 purificada.**Tabla 4.2** Valores de peso molecular y punto isoeléctrico teóricos y experimentales de la enzima Bgl1

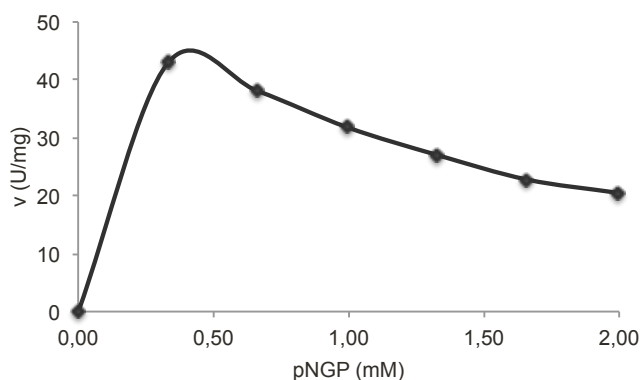
	Teórico	Experimental
Peso molecular	95 kDa	110 kDa
Punto isoeléctrico	5,1	5,3

### 4.1.2 Caracterización cinética de la enzima Bgl1

Para la caracterización cinética de la enzima Bgl1 se utilizaron dos tipos de sustratos: celobiosa como sustrato natural y un sustrato análogo colorimétrico derivado del nitrofenol, el p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido (pNGP).

#### 4.1.2.1 Perfil de actividad de la enzima Bgl1 usando pNGP como sustrato

El ensayo de actividad  $\beta$ -glucosidasa se llevó a cabo usando pNGP a distintas concentraciones en un rango de 0 a 2 mM. Se observa en la gráfica una caída de la actividad a concentraciones crecientes de sustrato (Figura 4.3). Esta inhibición a concentraciones altas de sustrato se ha observado previamente en otras enzimas  $\beta$ -glucosidasas caracterizadas (Daroit y col., 2008, Krogh y col., 2010). Este perfil podría explicarse por el fenómeno de transglicosilación, en el que la enzima Bgl1 a altas concentraciones de sustrato actuaría de forma reversa formando oligosacáridos de glucosa (Park y col., 2005). Debido a que la cinética de la enzimas Bgl1 frente a pNGP como sustrato no seguía el modelo de Michaelis-Menten el cálculo de las constantes cinéticas no pudo ser realizado.



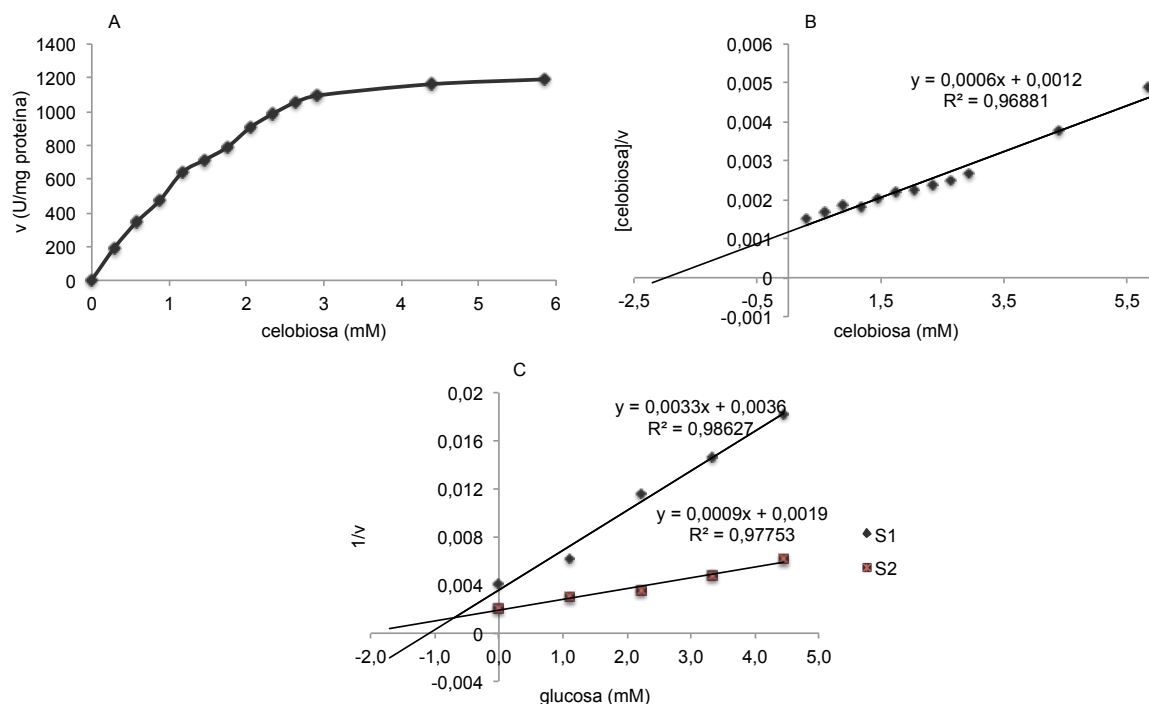
**Figura 4.3** Caracterización de la enzima Bgl1 frente a sustrato pNGP. Relación entre la actividad expresado en U/mg proteína y la concentración de sustrato.

#### 4.1.2.2 Perfil de actividad e inhibición de la enzima Bgl1 usando celobiosa como sustrato

Se llevó a cabo el ensayo de actividad con celobiosa como sustrato natural de la enzima, a distintas concentraciones. Se observó que en este caso el comportamiento de la enzima Bgl1 se ajustaba al modelo de Michaelis-Menten (Figura 4.4A). Para el cálculo de las constantes cinéticas sobre celobiosa se realizó la representación de Hanes-Woolf donde se enfrentan la relación entre sustrato y velocidad ( $[S]/v$ ) frente a la concentración de sustrato (Figura 4.4B). De la gráfica se obtuvieron las constantes cinéticas de la Bgl1 para la celobiosa resumidas en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3** Constantes cinéticas e inhibitorias de la enzima Bgl1 frente a celobiosa

$V_{max}$ (U/mg proteína)	1666
$K_m$ (mM)	2
$K_i$ glucosa (mM)	0,71



**Figura 4.4** Cálculo de las constantes cinéticas de la enzima Bgl1 frente a celobiosa (A) Relación entre la actividad expresada en U/mg proteína y la concentración de sustrato. (B) Representación secundaria de Hanes-Woolf de la enzima Bgl1 con celobiosa como sustrato. (C) Representación de Dixon de la inhibición por glucosa de Bgl1 con celobiosa como sustrato.

Se realizó el perfil de inhibición de la enzima Bgl1 por glucosa con celobiosa como sustrato. Para determinar las constantes inhibitorias se realizó la representación de Dixon (Figura 4.4C). Según este diagrama se puede deducir que la inhibición es competitiva, debido a que intersección de ambas rectas en el segundo cuadrante. Este punto de intersección permitió determinar la  $K_i$  glucosa, obteniéndose un valor de 0,71 mM.

#### 4.1.3 Desnaturalización térmica de la enzima Bgl1

Para la determinación de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) o temperatura de vida media de la enzima Bgl1 se llevó a cabo la desnaturalización térmica la enzima mediante la incubación de la misma durante 10 minutos en tampón acetato de sodio 200mM pH 5,0 en un rango de temperatura de 25°C a 80°C en intervalos de 5°C, tras lo que se realizó el ensayo estándar de actividad con pNGP para medir la actividad residual (Figura 4.5A). La enzima Bgl1 es estable hasta 60°C a partir de donde sufre una caída de su estabilidad. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) de la enzima es 69°C.

#### 4.1.4 Termorresistencia de la enzima Bgl1

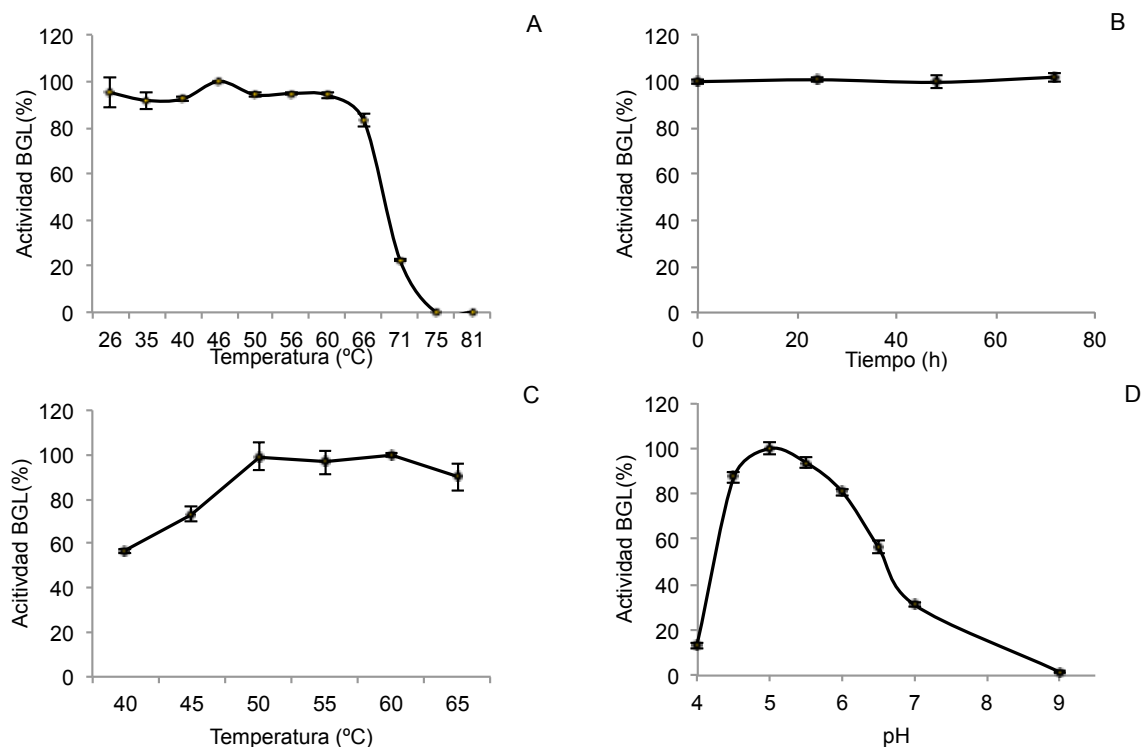
Emulando las condiciones de proceso de hidrólisis de biomasa se incubó la enzima Bgl1 durante 72h a 50°C y pH 5,0, tras lo que se determinó la actividad con pNGP (Figura 4.5B). La enzima mantuvo sus niveles de actividad durante toda la incubación, tomando el 100% como la actividad previa a la incubación.

#### 4.1.5 Temperatura óptima de la enzima Bgl1

Para determinar la temperatura óptima de la enzima Bgl1 se ensayó la actividad usando pNGP a distintas temperaturas comprendidas entre 40°C y 65°C (Figura 4.5C). Esta enzima tiene un amplio rango de temperatura óptima ya que mantiene el máximo de actividad entre 50° y 60°C, disminuyendo levemente su actividad a 65°C.

#### 4.1.6 pH óptimo de la enzima Bgl1

Se llevó a cabo el ensayo de actividad con pNGP con diferentes tampones en un rango de pH de 4,0 a 9,0 para la determinación del pH óptimo de la Bgl1 (Figura 4.5D). La mayor actividad se presentó a pH 5, manteniendo hasta un 80% de actividad entre pH 4,5 y pH 6. A pH 4,0 se observó una bajada drástica de la actividad del 85%.



**Figura 4.5** Caracterización de la enzima Bgl1 usando pNGP como sustrato. (A) Desnaturalización térmica. Se representa la actividad residual de la enzima tras la incubación de 10 minutos a las diferentes temperaturas. (B) Termorresistencia en condiciones de proceso de hidrólisis de biomasa: 50°C, pH 5,0 y 72h. (C) Temperatura óptima. (D) pH óptimo.

## 4.2 Purificación y caracterización de la enzima celobiohidrolasa 1 de *Myceliophthora thermophila* C1

La enzima celobiohidrolasa 1 (Cbh1), perteneciente a la familia GH7, es una de las proteínas mayoritarias del secretoma de *M. thermophila* C1 suponiendo entre el 20-25% del conjunto de proteínas secretadas. Esta enzima presenta una estructura modular que incluye un dominio catalítico, un dominio de unión a carbohidratos (CBD) y un péptido de unión que une ambos dominios. En el caldo extracelular de *M. thermophila* C1 existen dos isoformas de esta enzimas: con y sin CBD. Es una enzima procesiva que cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4 de los extremos reductores de las cadenas de celulosa liberando oligómeros de glucosa.

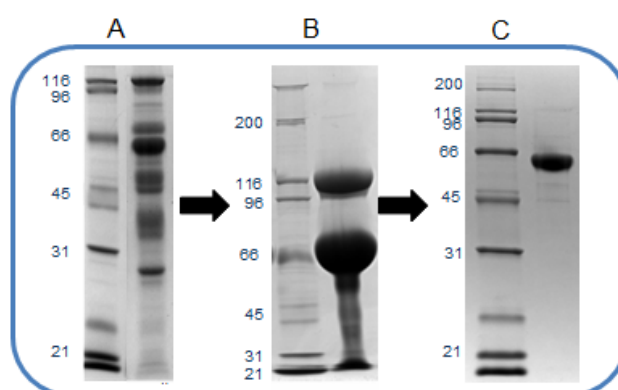
### 4.2.1 Purificación de la enzima Cbh1

La purificación de la enzima Cbh1 (en la versión con CBD) secretada al caldo de cultivo por *M. thermophila* C1 se inició con un primer paso cromatográfico de intercambio iónico en las mismas condiciones que se llevó a cabo para la purificación



de la enzima BglI procedente del mismo secretado. La purificación fue monitorizada mediante ensayo de actividad celobiohidrolasa (CBH) con Avicel como sustrato y geles SDS-PAGE de las fracciones retenidas en base a su carga neta. Para el siguiente paso de purificación se escogieron las fracciones en base a una alta actividad CBH y un perfil proteico donde se incluía la enzima Cbh1 de forma mayoritaria. Con estas fracciones se llevó a cabo una cromatografía de interacción hidrofóbica, de la cual se obtuvieron muestras que contenían la enzima Cbh1 con un alto grado de pureza electroforética. Estas fracciones se ensayaron para las actividades celulolíticas principales obteniéndose un resultado negativo para todas menos para la actividad CBH, cuya actividad específica fue de 157 U/g. Como se observa en la tabla de rendimiento de la purificación (Tabla 4.5), tanto la actividad específica como el factor de purificación disminuyen en vez de aumentar conforme se avanza en pasos de purificación. Esto es debido a que en el caldo secretado por *M. thermophila* C1 existen diversas enzimas con actividad sobre Avicel, como pueden ser otras celobiohidrolasas, endoglucanasas o polisacárido monooxigenasa en menor medida. El conjunto de estas enzimas hace que la actividad específica del caldo sea mayor que la de la enzima purificada.

La proteína fue identificada por huella peptídica como Celobiohidrolasa la de *M. thermophila* C1 (Cbh1).



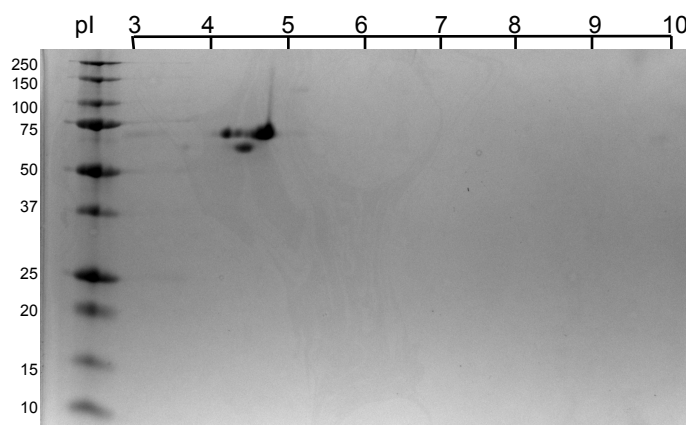
**Figura 4.6** Purificación de la enzima Cbh1 (A) Cóctel extracelular de *M. thermophila* C1 (B) Muestra enriquecida en Cbh1 tras la cromatografía de intercambio iónico. (C) Muestra purificada de Cbh1 tras la cromatografía de interacción hidrofóbica. Geles A y C SDS-PAGE 12%. Gel B SDS-PAGE 7,5%. En todos los casos el carril izquierdo muestra el marcador de peso molecular.

**Tabla 4.4** Rendimiento y factor de purificación de la enzima Cbh1 a partir del caldo extracelular de *M. thermophila* C1

Etapas	Proteína (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/g)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Caldo crudo	11040	3000	272	100	1
Intercambio iónico (Q-sefarosa)	5493	1560	284	52	1
Interacción hidrofóbica (Fenil sefarosa)	934	147	157	5	0,6

La actividad CBH se ensayó usando Avicel como sustrato.

La muestra de Cbh1 purificada se analizó mediante electroforesis bidimensional (Figura 4.7) observando distintas isoformas de la enzima. Dichas isoformas corresponden a diferentes modificaciones postraduccionales, probablemente glicosilaciones, que son las modificaciones más abundantes en este tipo de proteínas (Gusakov y col., 2008). El punto isoeléctrico experimental de las distintas isoformas de Cbh1 se encuentra entre 4 y 5, siendo el punto isoeléctrico teórico 4,8, sin las posibles modificaciones postraduccionales. En el caso del peso molecular se observa también una diferencia entre el peso teórico de 55 kDa y experimental de 64 kDa. Esta diferencia podría deberse igualmente a la presencia de polisacáridos unidos a la enzima.



**Figura 4.7** Electroforesis bidimensional de la enzima Cbh1 purificada

**Tabla 4.5** Peso molecular y punto isoeléctrico teóricos y experimentales de la enzima Cbh1

	Teórico	Experimental
<b>Peso molecular</b>	55 kDa	64 kDa
<b>Punto isoeléctrico</b>	4,8	4-5

#### 4.2.2 Caracterización cinética de la enzima Cbh1

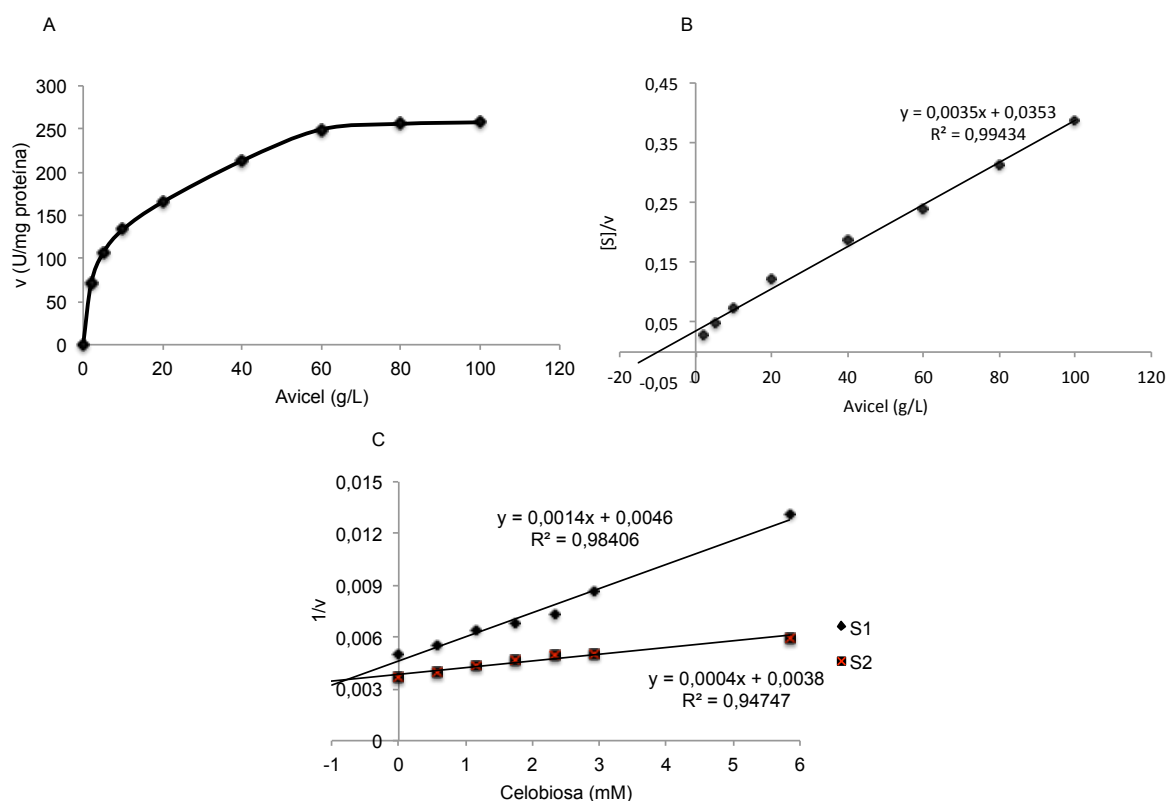
La caracterización cinética de la enzima Cbh1 se llevó a cabo con Avicel un rango 2 a 100 g/L como sustrato polimérico y con p-nitrofenil celobiosido (pNCB) como sustrato soluble en un rango de 0 a 3,2 mM. En ambos casos la actividad de la enzima se ajusta al modelo de Michaelis-Menten (Figura 4.8A y Figura 4.9A). Para el cálculo de las constantes cinéticas de la enzima Cbh1 se representó el diagrama de Hanes-Woolf donde se enfrentan la relación entre sustrato y velocidad ( $[S]/v$ ) frente a la concentración de sustrato (Figura 4.8B y Figura 4.9B). De la ecuación de la recta se obtienen las constantes cinéticas de la enzima Cbh1 para Avicel y para pNCB resumidas en la Tabla 4.6.

La inhibición de la enzima Cbh1 por glucosa y celobiosa se analizó tanto con Avicel como con pNCB como sustrato. Mientras que la glucosa no demostró ser

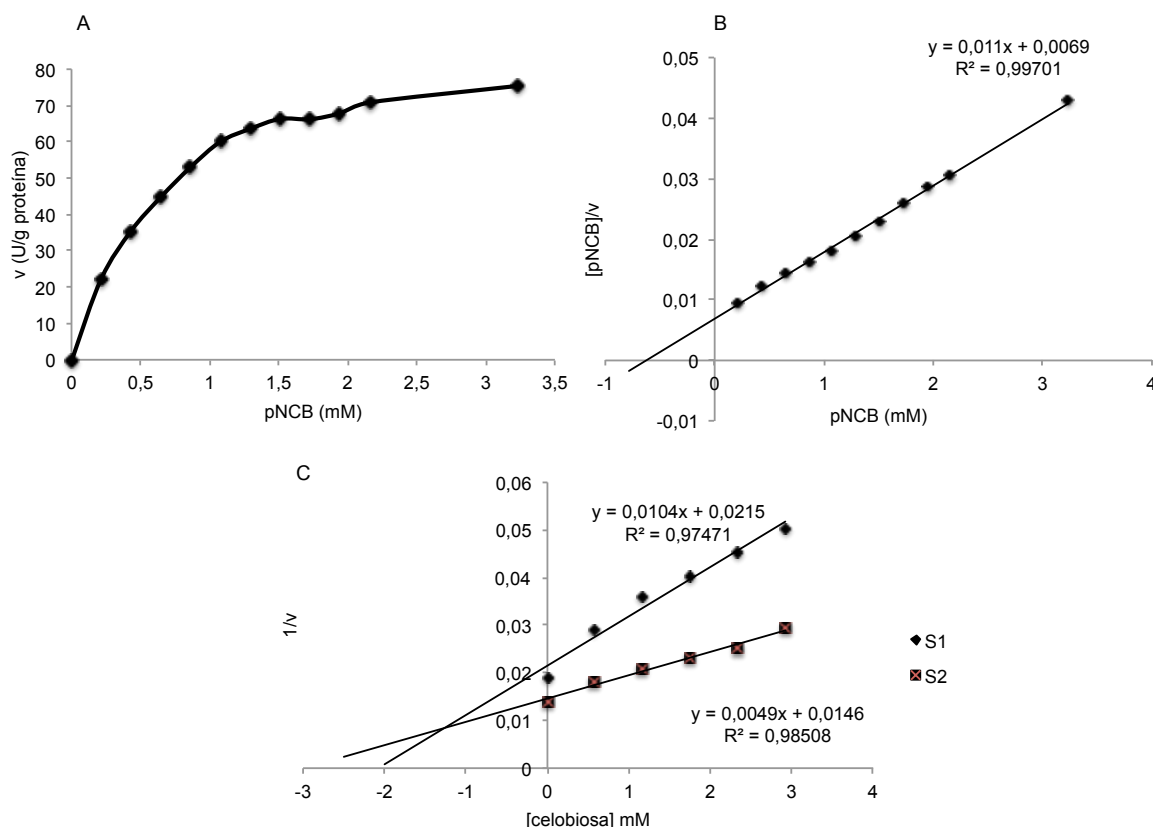
inhibidora de Cbh1 en las condiciones ensayadas, la celobiosa sí se comporta como inhibidora de esta enzima. A partir del diagrama de Dixon, que representa la inversa de la velocidad ( $1/v$ ) frente a la concentración de inhibidor, a dos concentraciones de sustrato se determinó una constante de inhibición de 0,8 mM con Avicel y de 1,25 mM con pNCB, deducida del punto de intersección de ambas rectas (Figura 4.8C y Figura 4.9C). De las gráficas se extrae que la celobiosa demuestra ser un inhibidor competitivo de la enzima Cbh1, debido a que la intersección de ambas rectas se produce en el segundo cuadrante.

**Tabla 4.6** Constantes cinéticas e inhibitorias de la enzima Cbh1 con Avicel y pNCB como sustratos

	Avicel	pNCB
$V_{\max}$ (U/g proteína)	286	91
$K_m$	10 g/L	0,63 mM
$K_i$ glucosa	No presenta inhibición	No presenta inhibición
$K_i$ celobiosa (mM)	0,80	1,25



**Figura 4.8** Caracterización cinética de la enzima Cbh1 de *M. thermophila* C1 con Avicel como sustrato. (A) Relación entre de velocidad y la concentración de sustrato. (B) Diagrama de Hanes-Woolf para el cálculo de las constantes cinéticas. Se representa la relación entre sustrato y velocidad ( $[S]/v$ ) frente a la concentración de sustrato. (C) Diagrama de Dixon de la inhibición de Cbh1 por celobiosa con Avicel como sustrato. Se representa la inversa de la velocidad ( $1/v$ ) frente a la concentración de inhibidor a dos concentraciones de sustrato.



**Figura 4.9** Caracterización cinética de la enzima Cbh1 de *M. thermophila* C1 con pNCB como sustrato. (A) Relación entre de velocidad y la concentración de sustrato. (B) Diagrama de Hanes-Woolf para el cálculo de las constantes cinéticas. Se representa la relación entre sustrato y velocidad ( $[S]/v$ ) frente a la concentración de sustrato. (C) Diagrama de Dixon de la inhibición de Cbh1 por celobiosa con Avicel como sustrato. Se representa la inversa de la velocidad ( $1/v$ ) frente a la concentración de inhibidor a dos concentraciones de sustrato.

#### 4.2.3 Desnaturalización térmica de la enzima Cbh1

Con el objetivo de determinar la estabilidad frente a la desnaturalización térmica de la enzima Cbh1 se incubó la durante 10 minutos en tampón acetato de sodio 200 mM pH 5,0 en un rango de temperaturas de 25°C a 80°C en intervalos de 5°C, tras lo cual se realizó el ensayo de actividad a 50°C para determinar la actividad residual (Figura 4.10A).

La enzima Cbh1 es estable hasta 50°C presentando el 100% de su actividad. A partir de esta temperatura comienza la desnaturalización térmica. Se determinó que la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de la enzima Cbh1 es de 63 °C.

#### 4.2.4 Termorresistencia de la enzima Cbh1

Para comprobar la termorresistencia de la enzima Cbh1 durante el proceso de hidrólisis se llevó a cabo una incubación en las condiciones de proceso de sacarificación de biomasa: pH 5,0 y 50°C durante 72h. Se ensayó la actividad a tiempo cero y se tomaron muestras cada 24h para medir la actividad residual de la enzima (Figura 4.10B).

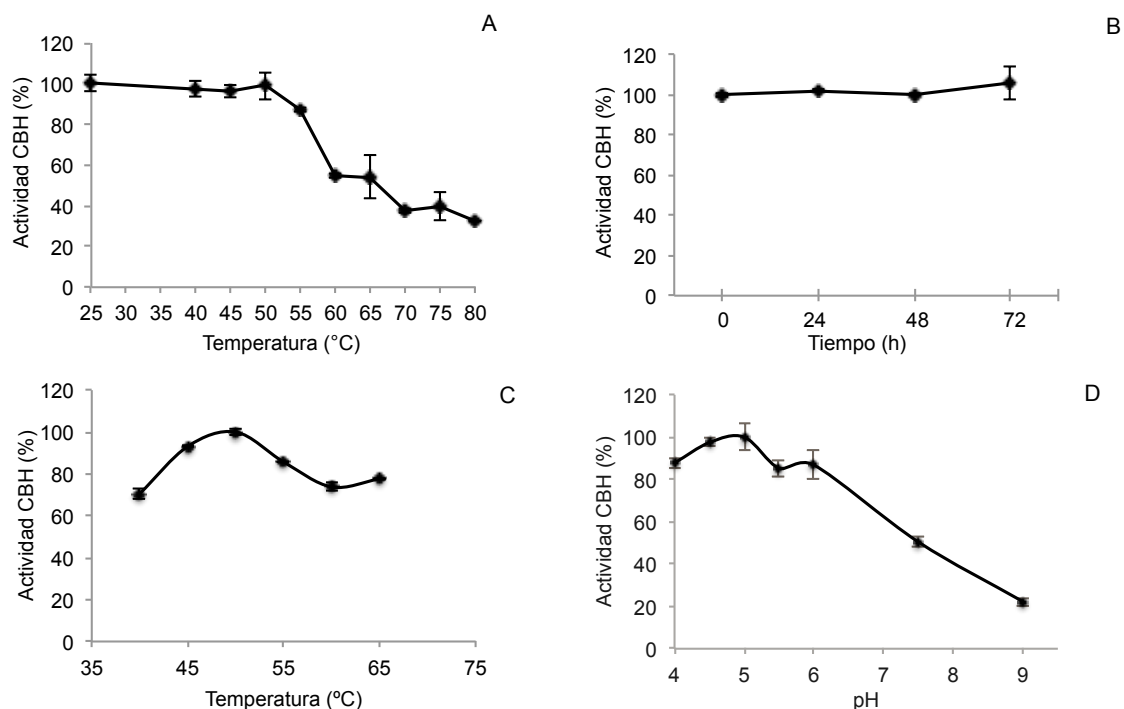
La enzima Cbh1 resultó mantener la totalidad de su actividad en las condiciones de proceso de hidrólisis enzimática.

#### 4.2.5 Temperatura óptima de la enzima Cbh1

La temperatura óptima de la enzima Cbh1 se determinó llevando a cabo el ensayo de actividad con Avicel en un rango de temperatura de 40°C a 65°C en intervalos de 5°C (Figura 4.10C). La temperatura óptima de la enzima es 50°C manteniendo al menos un 80% de actividad entre 45 y 55°C.

#### 4.2.6 pH óptimo de la enzima Cbh1

Para determinar el pH óptimo de la enzima Cbh1 se midió la actividad CBH utilizando Avicel como sustrato en un rango de pH de 4,0 a 9,0 (Figura 4.10D). La enzima Cbh1 presenta un máximo de actividad entre pH 4,5 y 5,0. Entre pH 5,5 y 6,0 mantiene un 80% de actividad mientras que a pH 7,5 su actividad se reduce a un 50%.



**Figura 4.10** Caracterización de la enzima Cbh1 con Avicel como sustrato. (A) Desnaturalización térmica. Se representa la actividad residual de la enzima tras la incubación frente a las distintas temperaturas de incubación. (B) Termorresistencia en condiciones de proceso: 50°C, pH 5,0 y 72h. (C) Temperatura óptima. (D) pH óptimo.

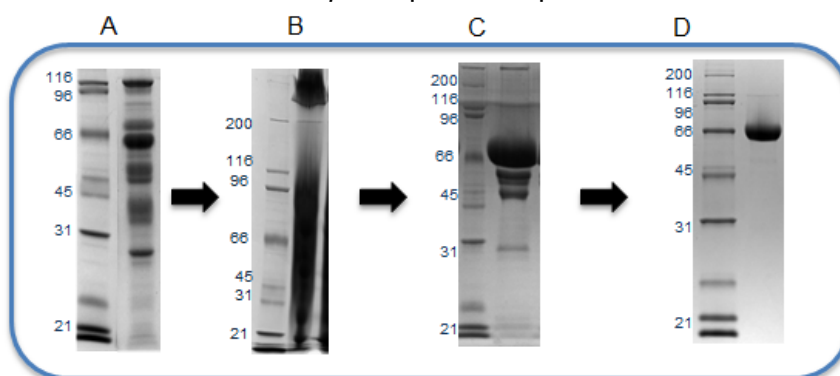
### 4.3 Purificación y caracterización de la enzima Celobiohidrolasa 4 de *Myceliophthora thermophila* C1

La enzima celobiohidrolasa 4 (Cbh4) es la segunda celobiohidrolasa mayoritaria del secretoma de *M. thermophila* C1 suponiendo un 15% del total de cóctel enzimático secretado. Perteneciente a la familia GH6, tiene un peso molecular de 72 kDa, comprendido por el dominio catalítico, un péptido de unión y un dominio de unión a carbohidratos. Es una enzima procesiva que cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4 de los extremos no reductores de las cadenas de celulosa liberando oligómeros de glucosa.

#### 4.3.1 Purificación de la enzima Cbh4

Para la purificación de la enzima Cbh4 del caldo extracelular de *M. thermophila* C1 se partió de un cóctel producido en condiciones industriales en bioreactor de 30L con una concentración de 92 g/L de proteína y una actividad CBH de 272 U/g. La purificación de esta enzima se inició aplicando el caldo extracelular pretratado a una columna de Q-sefarosa para llevar a cabo una cromatografía de intercambio aniónico. Localizadas las fracciones donde se encuentra la Cbh1 para descartarlas, se realizó un ensayo de actividad CBH con Avicel como sustrato y se observó el perfil proteico

mediante gel SDS-PAGE de las fracciones restantes. El pico de actividad CBH se encontró en la fracción no retenida de la columna de intercambio iónico, por lo que se concluyó que era ahí donde se encontraba la enzima Cbh4. Las proteínas que componen estas fracciones se encuentran cargadas positivamente de manera que no son retenidas por la columna. Con las fracciones escogidas se llevó a cabo una cromatografía de interacción hidrofóbica aplicando la muestra a una columna fenil-sefarosa. Aquellas fracciones que concentraron la actividad CBH a la vez que se observó en el gel una proteína mayoritaria con el tamaño de Cbh4 se concentraron y se sometieron a cromatografía de exclusión molecular por una columna Superdex 75 para separar las proteínas en base a su tamaño. De esta última etapa de purificación se obtuvo una muestra de enzima Cbh4 con un alto grado de pureza electroforética. En la Figura 4.11 se muestran los geles de proteína como resumen de las distintas etapas de la purificación de la enzima Cbh4. La muestra purificada se ensayó frente a las actividades celulolíticas principales obteniéndose resultados negativos para todas menos para la actividad CBH, para la que mostró una actividad específica de 268 U/g. En la Tabla 4.7 se resume el rendimiento de la purificación de esta enzima. La muestra se identificó por huella peptídica mediante el uso de MALDI-TOF/TOF como Celobiohidrolasa IIb de *M. thermophila* que corresponde a la enzima Cbh4.



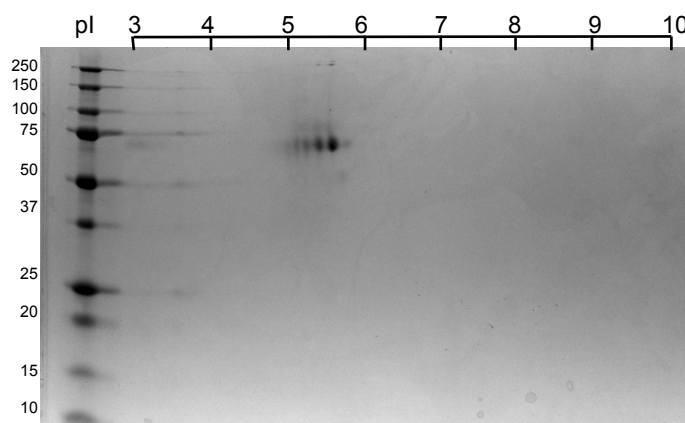
**Figura 4.11** Purificación de la enzima Cbh4. (A) Cóctel extracelular de *M. thermophila* C1 (B) Fracción no retenida tras la cromatografía de intercambio iónico. (C) Muestra enriquecida en la enzima Cbh4 tras la cromatografía de interacción hidrofóbica. (D) Muestra purificada de la enzima Cbh4 tras la cromatografía de exclusión molecular. Geles A, C y D SDS-PAGE 12%. Gel B SDS-PAGE 7,5%. En todos los casos el carril izquierdo muestra el marcador de peso molecular.

**Tabla 4.7** Rendimiento y factor de purificación de la enzima Cbh4 a partir del caldo extracelular de *M. thermophila* C1

Etapas	Proteína (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/g)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Caldo crudo	11040	2980	272	100	1
Intercambio iónico (Q-sefarosa)	5493	1157	366	39	1,3
Interacción hidrofóbica (Fenil sefarosa)	934	340	264	11	1
Exclusión molecular (Superdex-75)	308	83	268	3	1

La actividad se ensayó usando Avicel como sustrato.

La muestra purificada de la enzima Cbh4 se analizó mediante electroforesis bidimensional en un rango de pH de 3 a 10 (Figura 4.12). El patrón observado demuestra la existencia de distintas isoformas de la enzima debido a las diferentes modificaciones postraduccionales, probablemente glicosilaciones tal y como está descrito (Gusakov y col., 2008). Se observó un incremento en el tamaño experimental frente al teórico, debido probablemente a las modificaciones postraduccionales que sufre la enzima, así como una mayor dispersión en el punto isoeléctrico observado frente al predicho en base a la secuencia de aminoácidos (Tabla 4.8).



**Figura 4.12** Electroforesis bidimensional de la enzima Cbh4 purificada.

**Tabla 4.8** Peso molecular y punto isoeléctrico teóricos y experimentales de la enzima Cbh4.

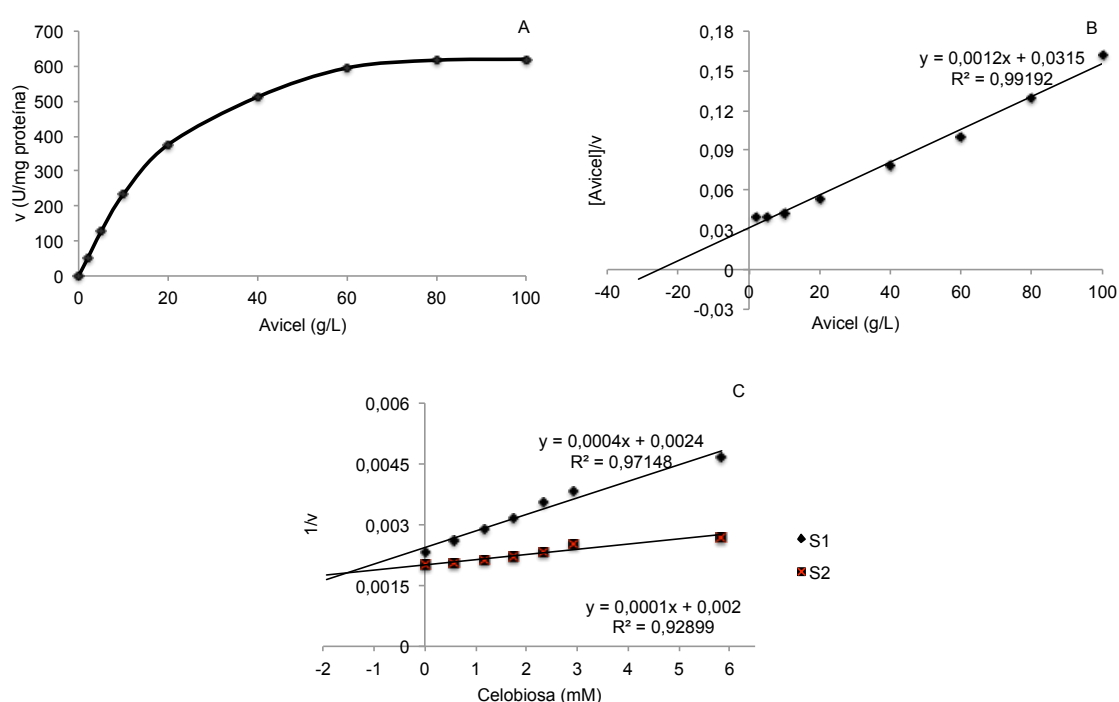
	Teórico	Experimental
<b>Peso molecular</b>	51 kDa	70 kDa
<b>Punto isoeléctrico</b>	5,2	5,2-5,7

#### 4.3.2 Caracterización cinética de la enzima Cbh4

Para la determinación de las constantes cinéticas se midió la actividad CBH con Avicel como sustrato a distintas concentraciones de sustrato en un rango de 2 a 100 g/L. En la gráfica donde se representa la velocidad de reacción frente a la concentración de sustrato se observa que la cinética se ajusta al modelo de Michaelis-Menten (Figura 4.13A). Para el cálculo de las constantes cinéticas se representó el diagrama de Hanes-Woolf donde se enfrenta la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad ( $[S]/v$ ) frente la concentración de sustrato ( $[S]$ ) (Figura 4.13B). De la ecuación de la gráfica se calcularon las constantes cinéticas para la enzima Cbh4 especificadas en la Tabla 4.9.



Para el estudio de la inhibición de la enzima Cbh4 por glucosa y celobiosa se llevó a cabo el ensayo de actividad con Avicel como sustrato en un rango de 0 a 6mM de inhibidor. Mientras la glucosa no demostró ser un inhibidor en las condiciones ensayadas, la celobiosa, siendo producto de reacción de la Cbh4, demostró ser inhibidor de esta enzima. Para el cálculo de las constantes inhibitorias se partió del diagrama de Dixon donde se representa la inversa de la velocidad ( $1/v$ ) frente a concentraciones crecientes de inhibidor ( $[I]$ ) a dos concentraciones distintas de sustrato (Figura 4.13C). Del punto de intersección de ambas ecuaciones de la gráfica se obtiene un valor de la  $K_i$  de de 1,3 mM para la celobiosa. Debido a que la intersección de las rectas del diagrama de Dixon tiene lugar en el segundo cuadrante de la gráfica, concluimos que la celobiosa es un inhibidor competitivo de la enzima Cbh4.



**Figura 4.13** Caracterización cinética de la enzima Cbh4 con Avicel como sustrato. (A) Relación entre de velocidad y la concentración de sustrato. (B) Diagrama de Hanes-Woolf para el cálculo de las constantes cinéticas. Se presenta la relación entre sustrato y velocidad ( $[S]/v$ ) frente a la concentración de sustrato. (C) Diagrama de Dixon de la inhibición por celobiosa. Se representa la inversa de la velocidad frente a la concentración de inhibidor a dos concentraciones de sustrato.

**Tabla 4.9** Constantes cinéticas e inhibitorias de la enzima Cbh4 con Avicel como sustrato.

$V_{max}$ (U/g proteína)	833
$K_m$ (g/L)	26,2
$K_i$ glucosa	No presenta inhibición
$K_i$ celobiosa (mM)	1,3

#### 4.3.3 Desnaturalización térmica de la enzima Cbh4

Para llevar a cabo la desnaturalización térmica de la enzima Cbh4 se incubó en periodos de 10 minutos en tampón acetato de sodio 200 mM pH 5,0 a distintas temperaturas en un rango de temperatura ambiente a 80°C en intervalos de 5°C, tras lo cual se realizó el ensayo de actividad. La enzima es estable a la incubación hasta 60°C donde su actividad cae radicalmente (Figura 4.14A). Se determinó la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de la enzima Cbh4 en 66°C.

#### 4.3.4 Termorresistencia de la enzima Cbh4

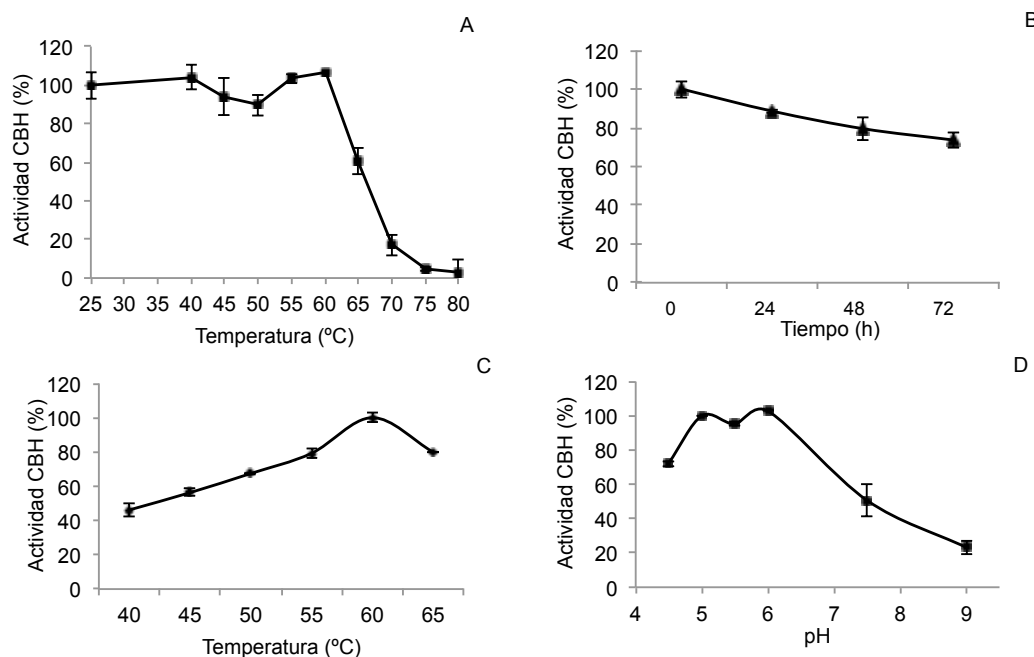
Con el objetivo de determinar si la enzima Cbh4 era resistente a las condiciones de proceso de hidrólisis de biomas se incubó la enzima a 50°C y pH 5,0 durante 72 horas, tomando muestras cada 24h para monitorizar la actividad residual de la enzima. Al analizar la actividad CBH con Avicel se observó una caída de la actividad del 10% en las primeras 24 horas, del 20% a las 48 horas y hasta casi un 30% de disminución de la actividad al fin de la incubación (Figura 4.14B).

#### 4.3.5 Temperatura óptima de la enzima Cbh4

Para determinar la temperatura óptima de la enzima se llevó a cabo el ensayo de actividad CBH con Avicel en un rango de temperaturas de 40°C a 65°C (Figura 4.14C). La enzima Cbh4 sufre un incremento de la actividad desde 40°C a 60°C donde alcanza su temperatura óptima. A 65°C la actividad se ve disminuida en un 20%. En las condiciones estándar del ensayo (50°C) la enzima Cbh4 tiene un 67% de su actividad máxima.

#### 4.3.6 pH óptimo Cbh4

Para determinar el pH óptimo de la enzima Cbh4 se llevó a cabo el ensayo de actividad CBH usando Avicel como sustrato a distintos pH en un rango de 4,5 a 9,0 (Figura 4.14D). La enzima tiene un pH óptimo entre 5,0 y 6,0 disminuyendo su actividad drásticamente a pH básicos.



**Figura 4.14** Caracterización de la enzima Cbh4 con Avicel como sustrato. (A) Desnaturalización térmica. Se representa el porcentaje de actividad residual tras la incubación a distintas temperaturas de la enzima. (B) Termorresistencia en condiciones de hidrólisis enzimática de biomasa: 50°C y pH 5,0 durante 72h. Se representa la actividad en porcentaje asumiendo el 100% al inicio de la incubación. (C) Temperatura óptima. (D) pH óptimo.

#### 4.4 Purificación y caracterización de la enzima Endoglucanasa 2 de *Myceliophthora thermophila* C1

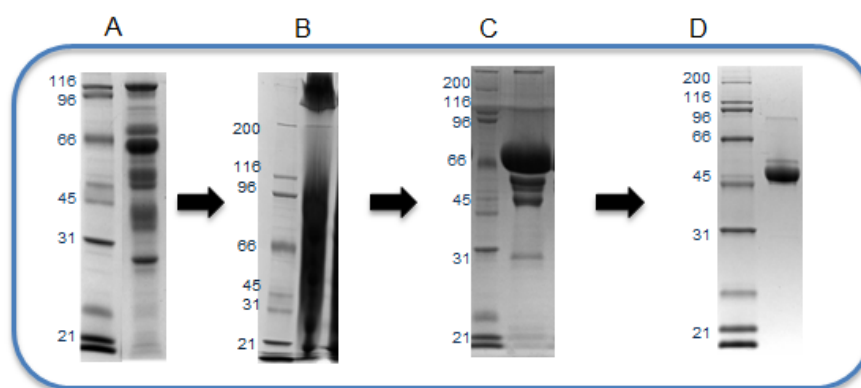
La enzima endoglucanasa 2 (Eg2) de *M. thermophila* C1 pertenece a la familia GH5. Representa un 10% del total de las proteínas secretadas por este organismo. Son las primeras enzimas en actuar en la degradación de la celulosa hidrolizando los enlaces glucosídicos  $\beta(1,4)$  de zonas internas de la cadena de celulosa, generando nuevos sitios de unión para la acción de las celobiohidrolasas. La estructura de esta proteína está compuesta por un dominio catalítico, un péptido de unión flexible y un dominio de unión a carbohidratos.

##### 4.4.1 Purificación de la enzima Eg2

Para la purificación de la enzima Eg2 se partió del caldo extracelular de *M. thermophila* C1 de producción en bioreactor de 30 L, con una concentración de 92 g/L y una actividad endoglucanasa (EG) de 11,4 U/mg. Se inició la purificación mediante una cromatografía de intercambio aniónico con la aplicación del caldo pretratado a una columna Q-sefamosa. Para monitorizar la purificación se ensayaron las fracciones resultantes en busca de actividad EG con sustrato azo-carboximetilcelulosa (Azo-

CMC) siguiendo el perfil proteico mediante gel SDS-PAGE. El pico de actividad EG se encontró en la fracción no retenida de la columna de intercambio aniónico. Las proteínas que componen estas fracciones se encuentran cargadas positivamente de manera que no son retenidas por la columna. Con estas fracciones se llevó a cabo una cromatografía de interacción hidrofóbica sometiendo dichas fracciones a una columna fenil-sefarosa, tras la cual, las fracciones con actividad EG se aplicaron a una columna Superdex 75 para llevar a cabo una cromatografía de exclusión molecular donde separar las proteínas en base a su tamaño. De esta tercera etapa de purificación se obtuvieron fracciones de Eg2 con un alto grado de pureza electroforética. La proteína resultante tenía una actividad específica de 74 U/mg con sustato Azo-CMC y 95 U/g con sustrato Avicel, ya que está descrita cierta actividad avicelasa minoritaria por parte de las endoglucanasas. En la Tabla 4.10 se resume el rendimiento de purificación de esta enzima.

La proteína se identificó por huella peptídica mediante el uso de MALDI-TOF/TOF como endoglucanasa 2 de *M. thermophila*.



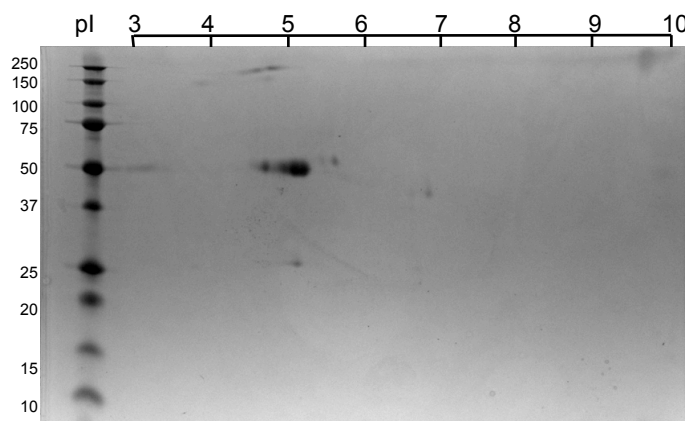
**Figura 4.15** Purificación de la enzima Eg2. (A) Cóctel extracelular de *M. thermophila* C1. (B) Fracción no retenida tras la cromatografía de intercambio iónico. (C) Muestra enriquecida en Eg2 tras la cromatografía de interacción hidrofóbica. (D) Muestra purificada de la enzima Eg2 tras la cromatografía de exclusión molecular. Geles A, C y D SDS-PAGE 12%. Gel B SDS-PAGE 7,5%. En todos los casos el carril izquierdo muestra el marcador de peso molecular.

**Tabla 4.10** Rendimiento y factor de purificación de la enzima Eg2 a partir del caldo extracelular de *M. thermophila* C1

Etapas	Proteína (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento %	Factor de purificación
Caldo crudo	11040	125400	11,4	100	1
Intercambio iónico (Q-sefarosa)	3158	80756	25,6	64	2,3
Interacción hidrofóbica (Fenil sefarosa)	1289	35285	27,4	28	2,4
Exclusión molecular (Superdex-75)	156	11544	74,0	9	6,5

La actividad se ensayó usando Azo-CMC como sustrato.

La muestra de la enzima Eg2 purificada se analizó mediante electroforesis bidimensional (Figura 4.16). El patrón observado muestra que existen distintas isoformas de la enzima probablemente diferenciadas por glicosilaciones variables en la longitud del oligosacárido, como previamente describió Gusakov (2008). El punto isoeléctrico predicho para la enzima es 5,1, sin embargo el experimental se encontró entre 4,7 y 5,1 debido a dichas isoformas. Igualmente se observó un incremento en el peso molecular entre el teórico y el experimental. Estos datos se recogen en la Tabla 4.11.



**Figura 4.16** Electroforesis bidimensional de la enzima Eg2 purificada del caldo enzimático secretado por *M. thermophila* C1.

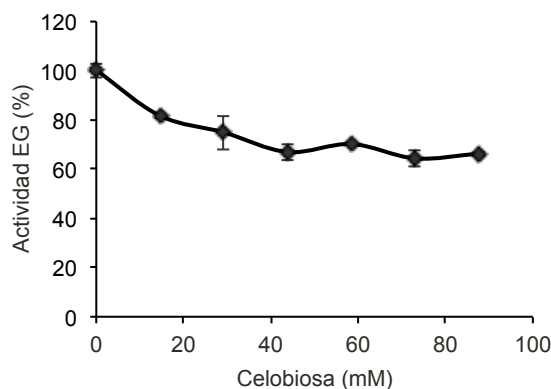
**Tabla 4.11** Peso molecular y punto isoeléctrico teóricos y experimentales de la enzima Eg2.

	Teórico	Experimental
<b>Peso molecular</b>	42 kDa	50 kDa
<b>Punto isoeléctrico</b>	5,1	4,7-5,1

#### 4.4.2 Inhibición de la enzima Eg2

Con el fin de comprobar la posible inhibición de la enzima Eg2 por glucosa y celobiosa se realizó un ensayo de actividad EG sobre Azo-CMC en presencia de las mismas. La glucosa se añadió en un rango de 0 y 0,55 M y la celobiosa de 0 a 88 mM.

Mientras que la glucosa no demostró ser inhibidor de esta enzima a las concentraciones ensayadas, la celobiosa provoca una inhibición de aproximadamente un 20% a 20 mM, llegando hasta un 60% de actividad a la máxima concentración de inhibidor utilizado (Figura 4.17).



**Figura 4.17** Inhibición por celobiosas de la enzima Eg2 utilizando Azo-CMC como sustrato.

#### 4.4.3 Desnaturalización térmica de la enzima Eg2

Para determinar la temperatura de fusión de la enzima ( $T_m$ ) o temperatura de vida media se incubó la enzima durante 10 minutos en tampón acetato de sodio 200 mM pH 5,0 en un rango de temperatura de 25° a 80°C a intervalos de 5°C. Tras la incubación se realizó el ensayo de actividad con Azo-CMC como sustrato para determinar la actividad residual (Figura 4.18A). La enzima Eg2 disminuye un 50% su actividad tras la incubación a 55°C, mientras que la incubación a partir de 60°C desnaturaliza la enzima por completo. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) de la enzima es de 54°C.

#### 4.4.4 Termorresistencia de la enzima Eg2

Para determinar la termorresistencia de la enzima Eg2 a las condiciones de proceso de hidrólisis de biomasa, 50°C, pH 5,0 durante 72h, se incubó esta enzima en dichas condiciones, tomando muestras cada 24h. La medida de actividad de cada una de las muestras tomadas mostró que la enzima Eg2 mantiene el 100% de su actividad durante todo el proceso (Figura 4.18B).

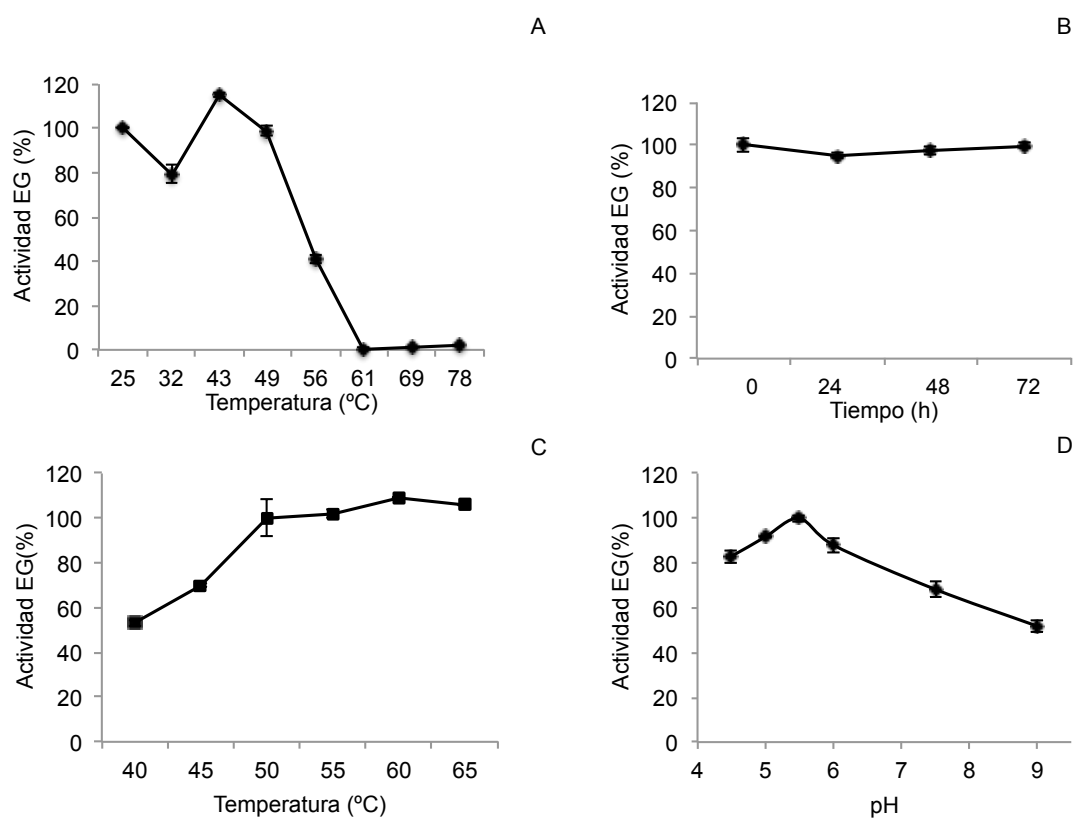
#### 4.4.5 Temperatura óptima de la enzima Eg2

Con el objetivo de determinar la temperatura óptima de la enzima Eg2 se realizó el ensayo de actividad EG frente a sustrato Azo-CMC en un rango de temperatura de 40° a 65°C (Figura 4.18C). La enzima Eg2 tiene un amplio rango de temperatura óptima ya que la enzima alcanza su máximo de actividad de 50° a 65°C, mientras que

disminuyendo la temperatura por debajo de 50°C sufre una importante caída de actividad de hasta un 40% a 40°C.

#### 4.4.6 pH óptimo de la enzima Eg2

Para determinar el pH óptimo de la enzima Eg2 se llevó a cabo una curva de pH en el rango de 4,5 a 9,0 con Azo-CMC como sustrato (Figura 4.18D). La actividad máxima se encuentra a pH 5,5, manteniendo entre pH 5 y 6 el 90% de la actividad óptima.



**Figura 4.18** Caracterización de la enzima Eg2 con Azo-CMC como sustrato. (A) Desnaturalización térmica. Se representa el porcentaje de actividad residual tras la incubación a las distintas temperaturas. (B) Termorresistencia en condiciones de proceso de hidrólisis de biomasa, 50°C, pH 5,0 y 72h. Se representa el 100% de la actividad como la actividad de la enzima previa a la incubación. (C) Temperatura óptima. (D) pH óptimo.

#### 4.5 Prueba funcional para la optimización del cóctel secretado por *Myceliophthora thermophila* C1

##### 4.5.1 Diseño de un cóctel sintético con el mínimo número de componentes para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica

La complejidad del cóctel completo puede ser abordada con el estudio de las principales enzimas de forma individual o combinándolas. El cóctel mínimo consiste en una mezcla de varias enzimas clave purificadas que permiten reproducir el cóctel enzimático completo o nativo de una forma más simplificada. El uso de esta potente herramienta permite evaluar la contribución de cada una de las enzimas empleadas en el mismo, así como de otras enzimas alternativas o suplementarias.

La elección de las enzimas empleadas para la composición del cóctel mínimo fue inicialmente en base a estudios previos de Gusakov y col. (2007) sobre la eficacia de distintas mezclas de celulasas sobre distintos tipos de materiales celulósicos. Como se avanzó en la introducción (Apartado 1.4.1), las enzimas que componen el caldo extracelular principalmente son las enzimas Bgl1, Cbh4, Cbh1 y Eg2, suponiendo el conjunto de éstas el 60% de la proteína total. Se escogieron por tanto estas enzimas para la combinación en el cóctel mínimo denominado CM 4 por ser las responsables mayoritarias de la capacidad celulolítica del cóctel y a la vez ser representativas de las principales actividades enzimáticas presentes en el mismo.

En primer lugar se llevó a cabo una hidrólisis de PCS con el cóctel completo secretado por *M. thermophila* C1 y un cóctel mínimo compuesto por las principales enzimas celulolíticas (CM 4), que previamente habían sido purificadas y caracterizadas en esta tesis. Las proporciones en el cóctel mínimo de cada una de las enzimas purificadas simulan las presentes en el cóctel completo y por tanto su dosificación depende de éstas (Tabla 4.12)

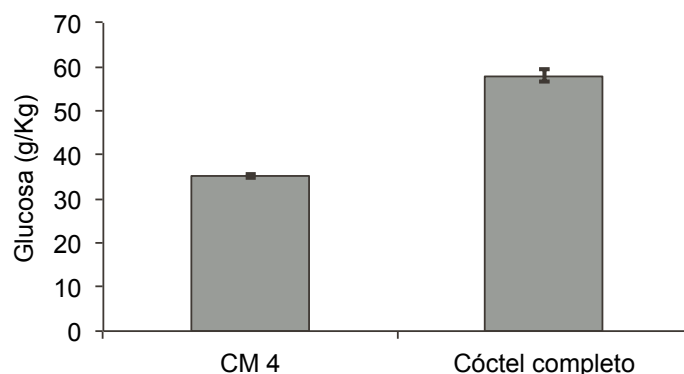
**Tabla 4.12** Dosificación de las 4 celulasas principales en el cóctel mínimo.

Condición	Cóctel	Eg2	Cbh1	Cbh4	Bgl1	Total
CM 4	0	2,27	3,99	1,3	1,08	8,64
Cóctel completo	8,64	0	0	0	0	8,64

La dosificación se muestra en miligramos de proteína por gramo de glucano.

La hidrólisis de PCS a 72h llevada a cabo con CM 4 libera 36 g/kg de glucosa, un 62% de la glucosa liberada por el cóctel industrial de *M. thermophila* C1 (Figura 4.19). Ante este resultado se decidió buscar enzimas accesorias que puedan complementar la acción de las celulasas en la degradación de la celulosa.

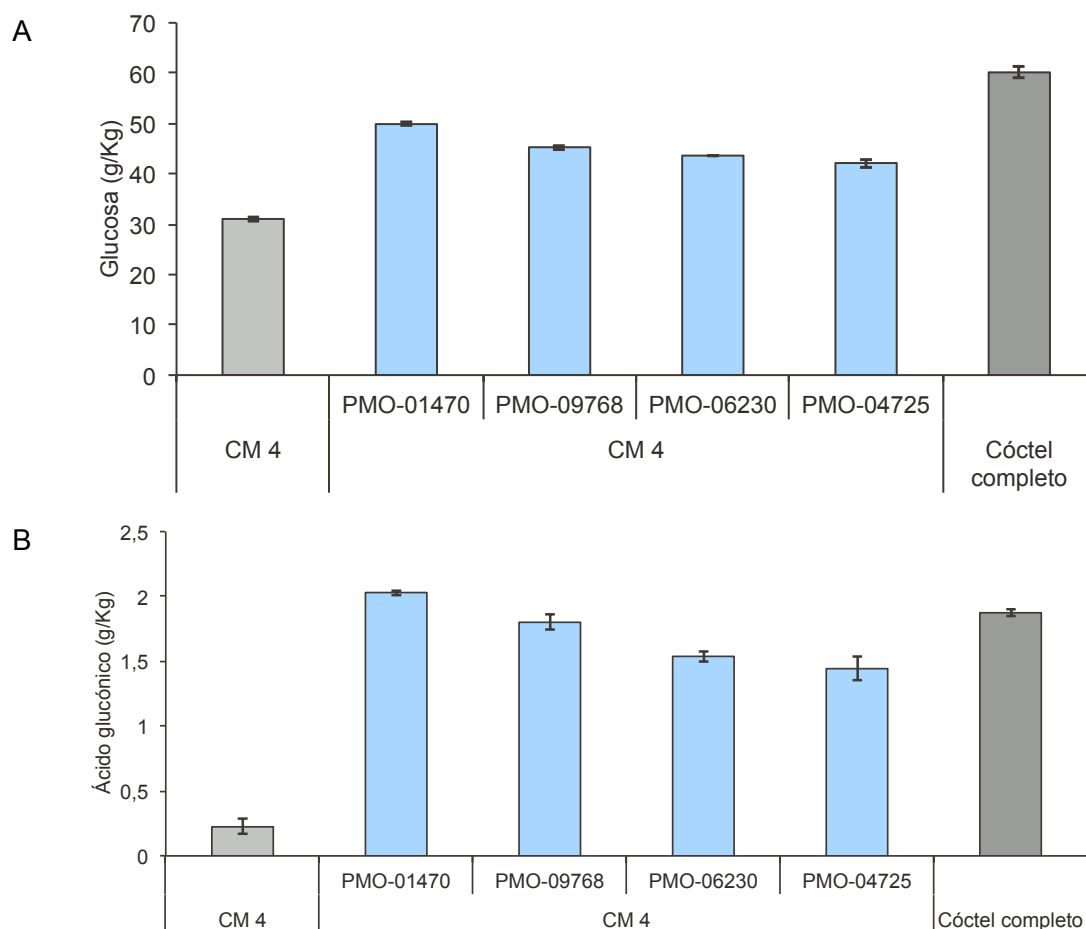




**Figura 4.19** Comparaci6n de la hidr6lisis de PCS mediada por el c6ctel completo secretado por *M. thermophila* C1 y CM 4, un c6ctel sint6tico a base de las cuatro celulasas principales (Bgl1, Cbh1, Cbh4 y Eg2). Se representa la concentraci6n de glucosa liberada (g/Kg de hidrolizado) a tiempo final 72h. Los datos son la media de dos repeticiones.

A pesar de que tradicionalmente se ha creído que la degradaci6n de la celulosa era llevada a cabo por la acci6n hidrolítica de las celulasas, en los 6ltimos ańos se han evidenciado ciertas enzimas auxiliares que contribuyen de manera significativa a este proceso. La oxidaci6n de los carbohidratos de las paredes celulares de las plantas realizada por las enzimas polisacárido monooxigenasas dependientes de cobre (PMO) es un claro ejemplo de ello, ya que su acci6n contribuye a la mejora del acceso de las celulasas al sustrato además de generar nuevos sitios de ataque para estas enzimas. Las enzimas PMO de hongos filamentosos se engloban dentro del grupo de enzimas auxiliares AA9, y existen 3 tipos principales. Las enzimas PMO AA9 de tipo 1 generan productos oxidados en el C1 de la glucosa mientras que las de tipo 2 oxidan en C4. A su vez, las tipo 3 oxidan tanto C1 como C4 con menor especificidad que los otros dos tipos. Existe dentro de la familia 3 un subconjunto de enzima fúngicas, llamado PMO3\*, que parece haber perdido su actividad en C4 y tan s6lo lleva a cabo su acci6n en C1 (Bey y col., 2013, Vu y col., 2013). En el secretoma de *M. thermophila* C1 se encuentran enzimas PMO tanto de tipo 1, como de tipo 2 y 3. Con el objetivo de determinar la mejora en liberaci6n de glucosa que supone la suplementaci6n de enzimas PMO sobre el c6ctel mínimo compuesto por las cuatro celulasas principales (CM 4), se purificaron las enzimas PMO más abundantes en el c6ctel. Así se obtuvieron las enzimas PMO-01470 y PMO-06230 de tipo 1, la PMO-09768 de tipo 3 y la enzima PMO-04725 de tipo 3\*. Con estas enzimas se llevó a cabo una hidr6lisis del material lignocelulósico en la que se suplementó con 2 mg/g de cada una de ellas sobre el CM 4.

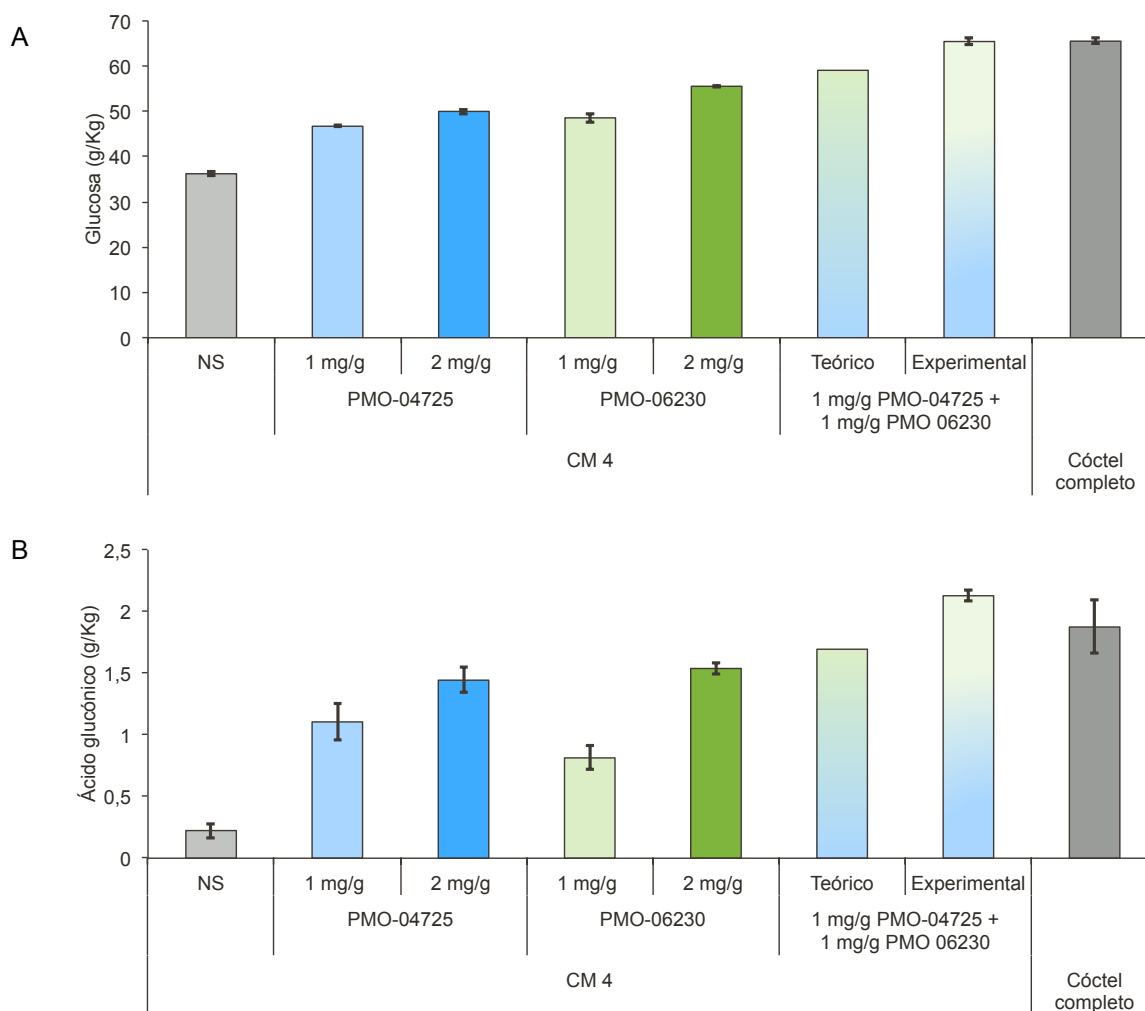
El mayor incremento en la liberaci6n de glucosa se observ6 con la suplementaci6n de la enzima PMO-01470, seguido por la PMO-09768, la PMO-06230 y por 6ltimo la PMO-04725, estando estos incrementos en el rango de 10 a 20 g/L, aunque en ninguno de los casos alcanzase el rendimiento del c6ctel completo de *M. thermophila* C1 (Figura 4.20A). De la misma manera los mayores incrementos del producto de oxidaci6n en C1, el ácido gluc6nico, se observan con la enzima PMO-01470, seguido por la PMO-09768 y al mismo nív el de las enzimas PMO-06230 y PMO-04725 (Figura 4.20B).



**Figura 4.20** Efecto de la suplementación de distintas enzimas PMO presentes en el caldo extracelular de *M. thermophila* C1 sobre CM 4. (A) Se representa la concentración de glucosa liberada (A) y ácido glucónico (B) en la hidrólisis de PCS con el CM 4 de las enzimas purificadas de *M. thermophila* C1 suplementando con PMO-01470, PMO-06230, PMO-04725 y PMO-09768, purificadas del caldo extracelular del hongo. La dosificación de las distintas enzimas fue en todos los casos: Eg2 2,27 mg/g de glucano, Cbh1 3,99 mg/g de glucano, Cbh4 1,3 mg/g de glucano, Bgl1 1,08 mg/g de glucano y 2 mg/g de glucano de cada una de las enzimas PMO correspondientes en cada caso. El cóctel completo de *M. thermophila* C1 se dosificó en 10,64 mg/g de glucano.

A pesar de alcanzar mayores rendimientos con las enzimas PMO-01470 y PMO-09768, las que se encuentran más representadas en el cóctel extracelular son las enzimas PMO-06230 y PMO-04725 que suponen aproximadamente un 10% del total de proteína secretado cada una. Por este motivo, se optó por seleccionar estas dos enzimas en combinación para constituir un cóctel mínimo sintético a base de las principales celulasas y estas dos enzimas PMO (CM 6) de manera que se lograra emular la liberación de glucosa en hidrólisis de la biomasa lignocelulósica mediada por el cóctel completo secretado por *M. thermophila* C1. Para ello se realizó una sacarificación con las enzimas purificadas, suplementando con las dos enzimas accesorias con actividad polisacárido monooxigenasa mayoritarias presentes en el secretado a distintas dosis y combinándolas entre ellas (Figura 4.21A). La suplementación de ambas enzimas accesorias aumentó la liberación de glucosa en ambos casos respecto al control del cóctel mínimo CM 4. La suplementación con la enzima PMO-06230 alcanzó mayores valores de liberación de glucosa que con la

enzima PMO-04725. Mientras que el aumento de dosis de la enzima PMO-06230 responde con una mayor conversión a glucosa de 7 g/Kg, en el caso del aumento de dosis con la enzima PMO-04725 parece haber llegado al límite, viéndose un incremento leve en la glucosa liberada. La combinación de ambas enzimas PMO llegó a liberar 65 g/kg de glucosa, el 100% de la liberación del cóctel completo. Existe un efecto sinérgico entre las enzimas PMO-06230 y PMO-04725 que supone un incremento mayor en el rendimiento cuando actúan juntas que cuando actúan por separado, con un factor de sinergia ( $K_{syn}$ ) de 1,1. Este mismo efecto se observa en la liberación de ácido glucónico, donde la  $K_{syn}$  es de 1,26, demostrando la sinergia entre las enzimas PMO tipo 1 y tipo 3\* (Figura 4.21 B). Atendiendo a la formación de este producto oxidado se advierte que la condición CM 4, carente de enzimas PMO, libera un producto residual, que se ve incrementado en las condiciones donde dichas enzimas están presentes.



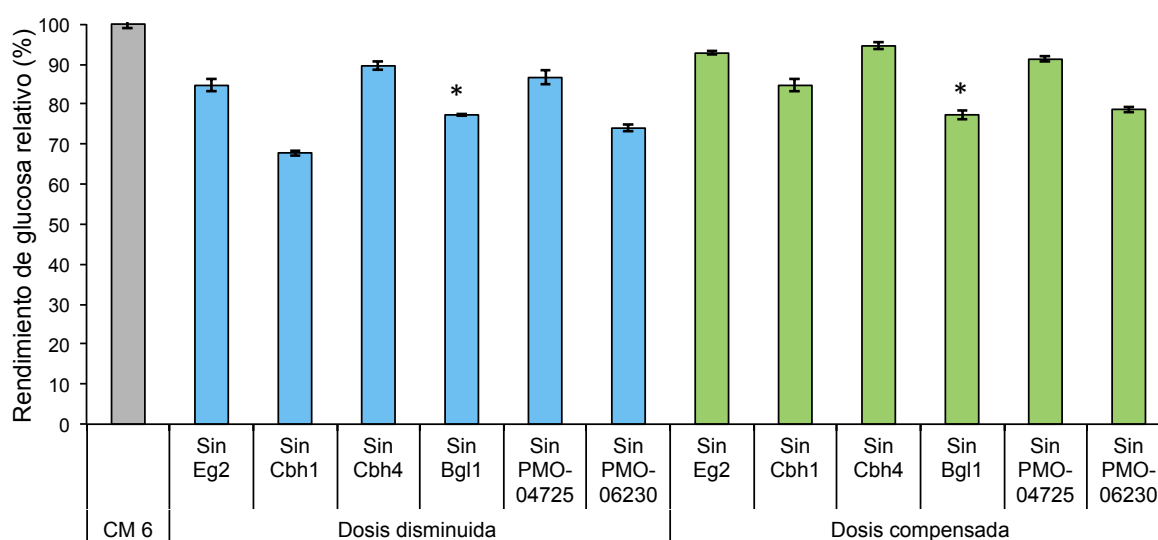
**Figura 4.21** Efecto de la suplementación de PMO-04725 y PMO-06230 sobre CM 4. Se representa la liberación de (A) glucosa y (B) ácido glucónico tras 72h de hidrólisis de PCS con CM 4 y suplementado con las dosis indicadas de enzimas PMO. La dosificación de las distintas enzimas fue en todos los casos: Eg2 2,27 mg/g de glucano, Cbh1 3,99 mg/g de glucano, Cbh4 1,3 mg/g de glucano, Bgl1 1,08 mg/g de glucano, PMO-06230 1 o 2 mg/g de glucano y PMO-04725 1 o 2 mg/g de glucano. El cóctel completo de *M. thermophila* C1 se dosificó en 10,64 mg/g de glucano. NS: no suplementado.

#### 4.5.2 Influencia individual de cada una de las celulasas en el cóctel mínimo (CM 6)

Para determinar la contribución de cada una de las celulasas a la hidrólisis de PCS llevada a cabo por el cóctel mínimo con enzimas PMO (CM 6), se eliminó cada una de las celulasas por separado, por un lado rebajando la dosis total de celulasas y por otro manteniendo la dosis total mediante el remplazo con las celulasas restantes. La dosificación de las distintas condiciones se muestra en la Tabla 4.13 mientras que el resultado de la hidrólisis se refleja en la Figura 4.22.

**Tabla 4.13.** Dosificación en miligramos por gramo de glucano de las celulasas

	Condición	Eg2	Cbh1	Cbh4	Bgl1	PMO-04725	PMO-06230	Dosis total
Dosis disminuida	Control	2,27	3,99	1,30	1,08	1,00	1,00	10,64
	Sin Eg2	0,00	3,99	1,30	1,08	1,00	1,00	8,37
	Sin Cbh1	2,27	0,00	1,30	1,08	1,00	1,00	6,65
	Sin Cbh4	2,27	3,99	0,00	1,08	1,00	1,00	9,34
	Sin Bgl1	2,27	3,99	1,30	0,00	1,00	1,00	9,56
	Sin PMO-04725	2,27	3,99	1,30	1,08	0,00	1,00	9,64
	Sin PMO-06230	2,27	3,99	1,30	1,08	1,00	0,00	9,64
Dosis compensada	Sin Eg2	0,00	5,08	1,65	1,37	1,27	1,27	10,64
	Sin Cbh1	3,65	0,00	2,07	1,72	1,60	1,60	10,64
	Sin Cbh4	2,58	4,54	0,00	1,24	1,14	1,14	10,64
	Sin Bgl1	2,54	4,44	1,44	0,00	1,11	1,11	10,64
	Sin PMO-04725	2,50	4,40	1,45	1,19	0,00	1,10	10,64
	Sin PMO-06230	2,50	4,40	1,45	1,19	1,10	0,00	10,64



**Figura 4.22** Rendimiento de glucosa relativo a 72 horas en hidrólisis de PCS con CM 6 eliminando cada una de las celulasas de manera individual. En azul se representa la eliminación de cada una de las celulasas del cóctel sintético. En verde se representa la eliminación de cada una de las celulasas remplazando la dosis por las celulasas restantes.\* Suma de glucosa más celobiosa.

Los resultados fueron los siguientes:

- La eliminación de Eg2 en el cóctel mínimo supone la bajada de un 15% de rendimiento en liberación de glucosa. Cuando se reemplaza la dosis de esta enzima por el resto de la celulasas se alcanza un 93% del rendimiento del control del cóctel mínimo.
- La eliminación de Cbh1 en el cóctel mínimo supone la bajada de un 32% de rendimiento en liberación de glucosa. Cuando se reemplaza la dosis de Cbh1 por el resto de la celulasas se alcanza un 85% del rendimiento del control del cóctel mínimo.
- La eliminación de Cbh4 en el cóctel mínimo supone la bajada de un 10% de rendimiento en liberación de glucosa. Cuando se reemplaza la dosis de esta celobiohidrolasa por el resto de la celulasas se alcanza un 95% del rendimiento del control del cóctel mínimo.
- La eliminación de Bgl1 en el cóctel mínimo supone la bajada de un 23% de rendimiento, expresado como la suma de glucosa y celobiosa. Cuando se reemplaza la dosis de Bgl1 por el resto de la celulasas se alcanza un 77% del rendimiento del control del cóctel mínimo ya que el resto de celulasas no compensa la falta de Bgl1.
- La eliminación de PMO-04725 en el cóctel mínimo supone la bajada de un 13% de rendimiento en liberación de glucosa. Cuando se reemplaza la dosis de esta PMO por el resto de la celulasas se alcanza un 91% del rendimiento del control del cóctel mínimo.
- La eliminación de PMO-06230 en el cóctel mínimo supone la bajada de un 26% de rendimiento en liberación de glucosa. Cuando se reemplaza la dosis de esta PMO por el resto de la celulasas se alcanza un 79% del rendimiento del control del cóctel mínimo.

#### 4.5.3 Optimización de las proporciones de las distintas celulasas en el cóctel mínimo (CM 6)

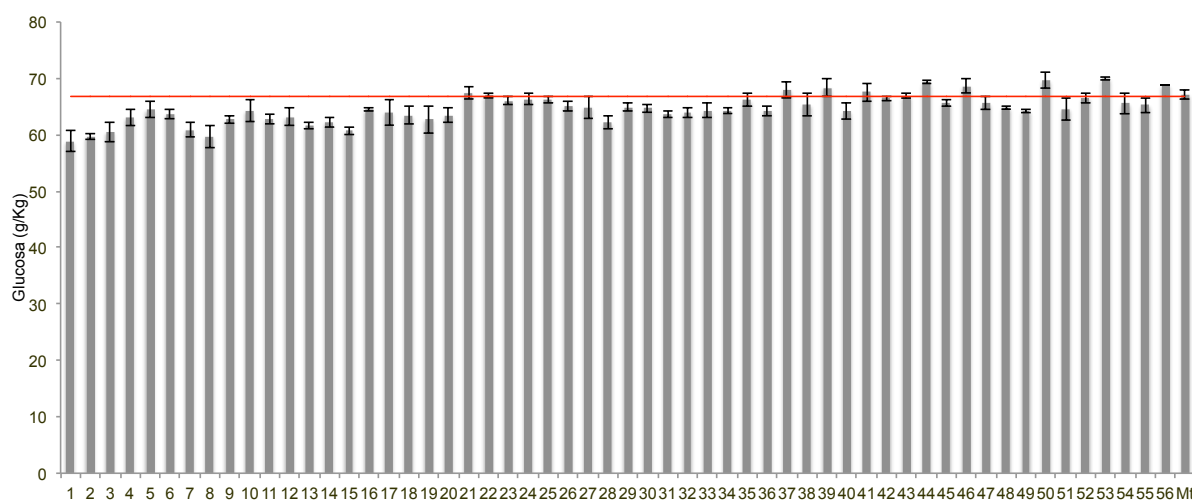
La eficiencia hidrolítica de un complejo multi-enzimático en el proceso de sacarificación de material lignocelulósico depende tanto de las propiedades individuales de cada uno de los componentes enzimáticos como de las proporciones de los mismos.

*M. thermophila* se encuentra en la naturaleza en ambientes con materia orgánica lignocelulósica en descomposición bajo condiciones ambientales variables de temperatura, humedad y pH, de forma que la secreción de un cóctel de diversas celulasas con un amplio rango de actividad óptima representa una ventaja competitiva. Sin embargo para su aplicación industrial a la hidrólisis de biomasa lignocelulósica pretratada en que las condiciones son preestablecidas y uniformes para todas las enzimas del cóctel, puede que las proporciones de cada una de las enzimas principales presentes en el secretoma no sean las óptimas. Una vez definidos aquellos componentes necesarios en el cóctel mínimo para reproducir el rendimiento del cóctel

completo y conocidas sus proporciones en el secretoma de este organismo, se llevó a cabo un reajuste de las proporciones de los componentes para la optimización de la liberación de glucosa en hidrólisis de PCS.

Utilizando el programa estadístico StatGraphics Plus, se realizó un diseño experimental para optimización de mezclas. Partiendo de las proporciones estándar que reflejan la representación de cada una de las enzimas en el cóctel secretado por *M. thermophila* C1, se variaban las proporciones de las distintas celulasas incluidas en el cóctel mínimo (CM 6) dentro de unos límites establecidos, resultando un diseño experimental con 56 combinaciones de mezclas o proporciones del cóctel. En la Tabla 4.14 se muestran las dosificaciones de las celulasas de cada una de las condiciones. Como control se incluyeron las proporciones estándar y el cóctel completo a una dosis de 10,64 mg de proteína por gramo de glucano.

Con las combinaciones diseñadas se llevó a cabo la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica y se analizó la glucosa liberada a 72h. Determinadas combinaciones superaron el rendimiento en glucosa de las proporciones estándar como las condiciones 53 o 50 que liberan hasta 3 g/Kg más. Otras condiciones como la 37, 39, 44 y 46 muestran incrementos más moderados (Figura 4.23).



**Figura 4.23** Liberación de glucosa expresada en gramos por kilogramo de hidrolizado de cada una de las condiciones con distintas proporciones diseñadas por el programa estadístico StatGraphics. La línea roja representa la liberación de la condición estándar. Mt: cóctel completo secretado por *M. thermophila* C1 a una dosis de 10,64 mg/g glucano. Los valores representan la media de dos repeticiones.

**Tabla 4.14.** Dosificación de las distintas celulasas para la optimización de las proporciones del cóctel mínimo (CM 6) para la hidrólisis de PCS.

Condición	Eg2	Cbh1	Cbh4	Bgl1	PMO-04725	PMO-06230
1	3,18	4,83	0,78	0,65	0,60	0,60
2	2,42	5,59	0,78	0,65	0,60	0,60
3	3,18	3,79	1,82	0,65	0,60	0,60
4	1,38	5,59	1,82	0,65	0,60	0,60
5	1,36	5,59	1,82	0,67	0,60	0,60
6	1,36	5,59	1,82	0,65	0,62	0,60
7	1,36	5,59	1,82	0,65	0,60	0,62
8	3,18	3,97	0,78	1,51	0,60	0,60
9	1,56	5,59	0,78	1,51	0,60	0,60
10	1,36	5,59	0,98	1,51	0,60	0,60
11	1,36	5,59	0,78	1,51	0,80	0,60
12	1,36	5,59	0,78	1,51	0,60	0,80
13	1,36	4,74	1,82	1,51	0,60	0,60
14	3,18	2,93	1,82	1,51	0,60	0,60
15	3,18	2,39	1,82	1,51	1,13	0,60
16	3,18	2,39	1,82	1,51	0,60	1,13
17	3,18	4,03	0,78	0,65	1,40	0,60
18	1,62	5,59	0,78	0,65	1,40	0,60
19	1,36	5,59	1,04	0,65	1,40	0,60
20	1,36	5,59	0,78	0,91	1,40	0,60
21	1,36	5,59	0,78	0,65	1,40	0,86
22	1,36	4,81	1,82	0,65	1,40	0,60
23	3,18	2,99	1,82	0,65	1,40	0,60
24	3,18	2,39	1,82	1,25	1,40	0,60
25	3,18	2,39	1,82	0,65	1,40	1,20
26	1,36	4,98	0,78	1,51	1,40	0,60
27	3,18	3,17	0,78	1,51	1,40	0,60
28	3,18	2,39	1,55	1,51	1,40	0,60
29	3,18	2,39	0,78	1,51	1,40	1,37
30	2,91	2,39	1,82	1,51	1,40	0,60
31	1,36	3,94	1,82	1,51	1,40	0,60
32	3,18	4,03	0,78	0,65	0,60	1,40
33	1,62	5,59	0,78	0,65	0,60	1,40
34	1,36	5,59	1,04	0,65	0,60	1,40
35	1,36	5,59	0,78	0,91	0,60	1,40
36	1,36	5,59	0,78	0,65	0,86	1,40
37	1,36	4,81	1,82	0,65	0,60	1,40
38	3,18	2,99	1,82	0,65	0,60	1,40
39	3,18	2,39	1,82	1,25	0,60	1,40
40	3,18	2,39	1,82	0,65	1,20	1,40
41	1,36	4,98	0,78	1,51	0,60	1,40
42	3,18	3,17	0,78	1,51	0,60	1,40
43	3,18	2,39	1,55	1,51	0,60	1,40
44	3,18	2,39	0,78	1,51	1,37	1,40
45	2,91	2,39	1,82	1,51	0,60	1,40
46	1,36	3,94	1,82	1,51	0,60	1,40
47	1,36	5,05	0,78	0,65	1,40	1,40
48	3,18	3,23	0,78	0,65	1,40	1,40
49	3,18	2,39	1,62	0,65	1,40	1,40
50	3,18	2,39	0,78	1,49	1,40	1,40
51	2,98	2,39	1,82	0,65	1,40	1,40
52	1,36	4,01	1,82	0,65	1,40	1,40
53	3,15	2,39	0,78	1,51	1,40	1,40
54	1,36	4,18	0,78	1,51	1,40	1,40
55	2,11	2,39	1,82	1,51	1,40	1,40
56	1,36	3,14	1,82	1,51	1,40	1,40
Estándar	2,27	3,99	1,30	1,08	1,00	1,00

La dosificación se expresa de miligramos de proteína por gramo de glucano.

**Tabla 4.15** Resultados de ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo Cúbico Especial	335,31	40	8,38	3,2	0,009
Error total	39,29	15	2,62		
Total (corr.)	374,60	55			

$R^2$ :0,895;  $R^2$  ajustado por Gl: 0,615. Gl: grados de libertad

**Tabla 4.16** Dosificación óptima y límites establecidos de las distintas celulasas según el programa estadístico StatGraphics.

Enzima	Estándar	Límite inferior	Límite superior	Óptimo
<b>Eg2</b>	2,27	1,36	3,18	1,36
<b>Cbh1</b>	3,99	2,39	5,59	5,10
<b>Cbh4</b>	1,30	0,78	1,82	1,82
<b>Bgl1</b>	1,08	0,65	1,51	0,78
<b>PMO-04725</b>	1,00	0,60	1,40	0,60
<b>PMO-06230</b>	1,00	0,60	1,40	0,98

La dosificación se expresa en miligramos de proteína por gramo de glucano.

Los resultados de la hidrólisis se analizaron mediante el modelo cúbico. El valor-P para este modelo es menor que 0,05, lo que demuestra que existe una relación estadísticamente significativa entre glucosa y los componentes (enzimas), con un nivel de confianza del 95,0%. El análisis de la varianza (ANOVA) se encuentra resumido en la Tabla 4.15. El estadístico  $R^2$  indica que el modelo, así ajustado, explica 89,5% de la variabilidad en los valores de glucosa, dejando un 10,5% de la variabilidad no explicada por el modelo. El estadístico  $R^2$  ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 61,5%. La baja correlación presente en el modelo es debida a que el programa no tiene en cuenta el factor de sinergia entre enzimas.

El programa determinó un valor óptimo de liberación de glucosa de 74 g/Kg. Siendo la liberación de glucosa de la condición control de proporciones estándar 66,8 g/Kg el reajuste de las proporciones del cóctel supone una mejora de 7,2 g/Kg en liberación de glucosa respecto a dicho control. La dosificación óptima de cada una de las enzimas se encuentra reflejada en la tabla 4.16. Comparando con las proporciones estándar del CM 6, que son aquellas que simulan las encontradas en el caldo extracelular de *M. thermophila* C1, se requiere para su mayor eficiencia menor cantidad de las enzimas Eg2, Bgl1 y PMO-04725. Las proporciones óptimas de las enzimas Eg2 y PMO-04725 coinciden con el valores mínimo probado por lo que puede existir mayor rango de mejora. Las enzimas Cbh1 y Cbh4 son deficitarias en el cóctel estándar según los valores óptimos, coincidiendo la proporción óptima de Cbh4 con el máximo probado. La enzima PMO-06230 mantiene su proporción.



#### 4.5.4 Efecto del dominio de unión a carbohidratos de la enzima Cbh1 en la hidrólisis de PCS

La estructura de un gran número de celulasas está compuesta por un dominio catalítico, un péptido de unión y un dominio de unión a carbohidratos (CBD). Este último juega un importante papel en la unión de la enzima a la celulosa y como consecuencia mejora la actividad de la enzima (Tomme y col., 1988). En varios estudios a distintas concentraciones de sólidos totales se propone que, a bajas concentraciones de sólidos la ausencia del CBD de las celulasas supone una bajada en el rendimiento de hidrólisis respecto a aquellas celulasas que poseen CBD. Por el contrario, a alta concentración de sólidos las diferencias de rendimiento disminuyen, siendo comparables los valores de las condiciones con y sin CBD (Pakarinen y col., 2014; Le Costaouëc y col., 2013).

En el caldo secretado por *M. thermophila* C1 existen dos isoformas de Cbh1: con CBD y sin CBD. La actividad de ambas isoformas es distinta y sus proporciones en el caldo extracelular dependen principalmente de las condiciones de cultivo que pueden favorecer la ruptura proteolítica del conector, dando como resultado una mayor proporción de la isoforma sin CBD.

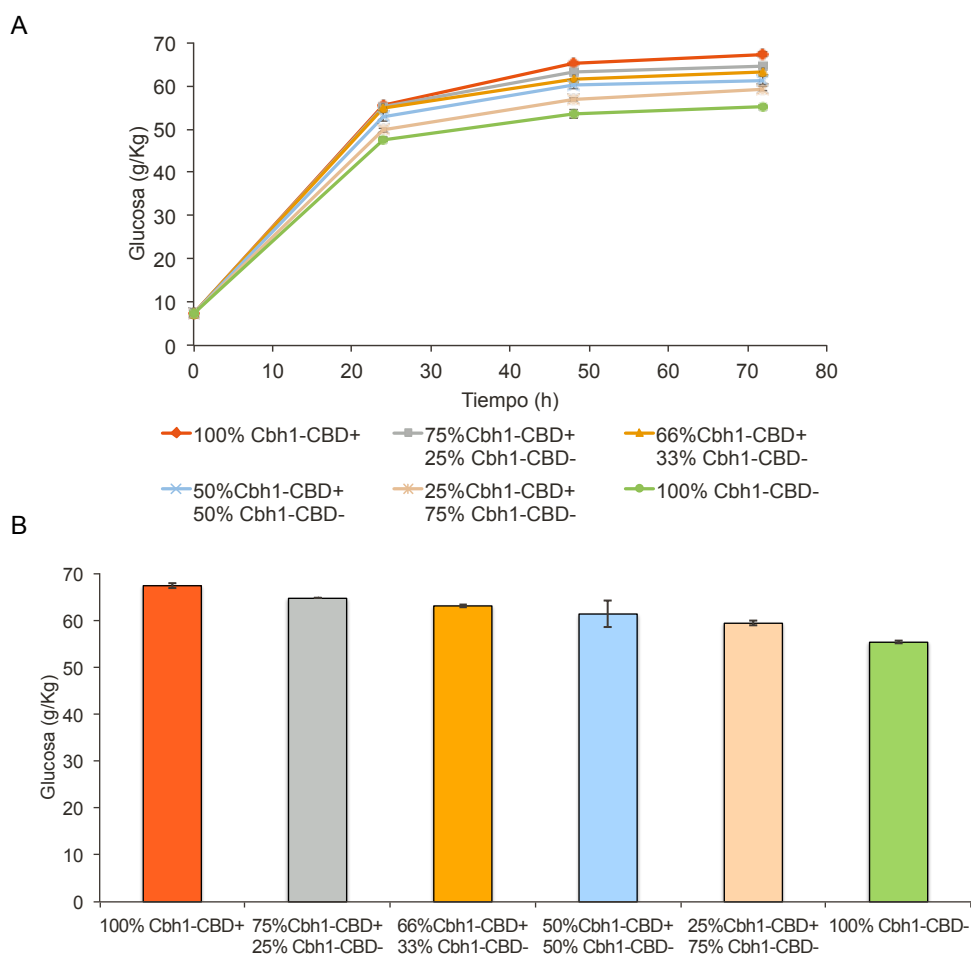
Debido a que las condiciones de proceso de hidrólisis en este proyecto son a alta concentración de sólidos totales (20%) y ante los precedentes citados, se decidió determinar la importancia del papel del CBD de la enzima Cbh1 en la hidrólisis de PCS. Para ello, y haciendo uso de la herramienta del cóctel sintético CM 6, se llevó a cabo una hidrólisis de la biomasa lignocelulósica con las enzimas puras, fijando las proporciones de Eg2, Cbh4, Bgl1, PMO-04725 y PMO-06230, y modificando las proporciones de la enzima Cbh1 con CBD por la isoforma sin CBD purificada del caldo de cultivo. En la Tabla 4.17 se muestra la dosificación empleada en cada condición.

**Tabla 4.17** Dosificación de las distintas celulasas presente en CM 6 en la hidrólisis de PCS para el estudio del efecto del CBD de la enzima Cbh1.

Condición	Eg2	Cbh1-CBD+	Cbh1-CBD-	Cbh4	Bgl1	PMO-04725	PMO-06230
100% Cbh1-CBD+	2,27	3,99	0,00	1,30	1,08	1,00	1,00
75% Cbh1-CBD+ 25% Cbh1-CBD-	2,27	1,00	2,99	1,30	1,08	1,00	1,00
66% Cbh1-CBD+ 33% Cbh1-CBD-	2,27	2,00	2,00	1,30	1,08	1,00	1,00
50% Cbh1-CBD+ 50% Cbh1-CBD-	2,27	2,99	1,00	1,30	1,08	1,00	1,00
25% Cbh1-CBD+ 75% Cbh1-CBD-	2,27	2,63	1,32	1,30	1,08	1,00	1,00
100% Cbh1-CBD-	2,27	0,00	3,99	1,30	1,08	1,00	1,00

La dosificación se expresa en miligramos de proteína por gramo de glucano. Cbh1-CBD+: Enzima Cbh1 con dominio de unión a carbohidratos CBD. Cbh1-CBD-: Enzima Cbh1 sin dominio de unión a carbohidratos.

Tras monitorizar la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica tomando muestra cada 24h se obtuvo la cinética de liberación de glucosa (Figura 4.24A). Se observó que desde tiempos cortos existía una correlación entre la proporción presente de isoforma Cbh1 con CBD y la liberación de glucosa, de manera que cuanto mayor era la relación Cbh1 con CBD:Cbh1 sin CBD mayores era los niveles de glucosa producidos. A tiempo final 72h se evidencia aún más esta relación, alcanzando concentraciones de glucosa de 67 g/Kg de hidrolizado en la condición donde se emplea la totalidad de la isoforma con CBD, mientras que cuando la totalidad de la isoforma empleada es sin CBD la concentración de glucosa liberada es de 55 g/Kg (Figura 4.24B).

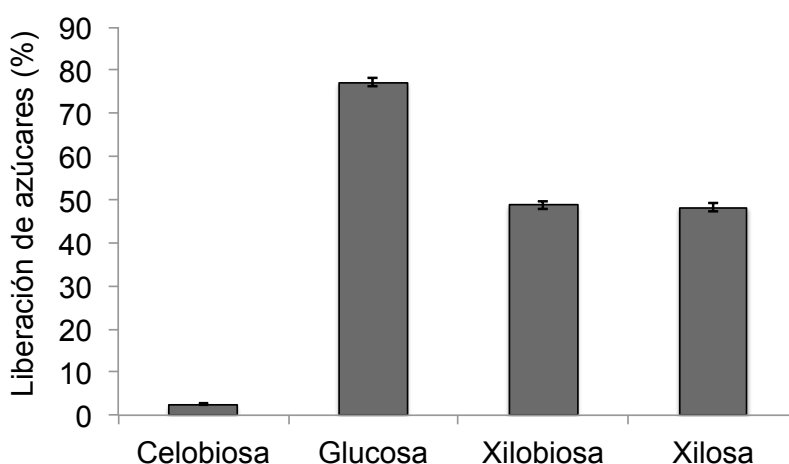


**Figura 4.24** Liberación de glucosa en la hidrólisis de PCS mediada por el cóctel sintético CM 6 con sustitución de la enzima Cbh1 con CBD por la isoforma sin CBD a distintas proporciones, para el estudio de la importancia del papel del CBD en el proceso. (A) Cinética de liberación. Se representa la concentración de glucosa en el eje de ordenadas frente al tiempo en el eje de abscisas. (B) Liberación de glucosa a tiempo final 72h. Los valores son la media de dos réplicas. Cbh1-CBD+: Enzima Cbh1 con dominio de unión a carbohidratos CBD. Cbh1-CBD-: Enzima Cbh1 sin dominio de unión a carbohidratos.

#### 4.6 Búsqueda y expresión de una enzima $\beta$ -xilosidasa en *Myceliophthora thermophila* C1

Como se describió previamente en la introducción (véase apartado 1.2), la hemicelulosa es el segundo polisacárido predominante en la lignocelulosa. Aproximadamente el 70% de la hemicelulosa está compuesta por polímeros de xilano, siendo por tanto la xilosa el monosacárido más abundante en la lignocelulosa tras la glucosa. En el proceso de obtención de bioetanol de segunda generación el aprovechamiento de la xilosa para la conversión a etanol es fundamental para el rendimiento global del proceso. Por este motivo, en la actualidad se trabaja tanto en la optimización de la hidrólisis de la hemicelulosa como en la modificación genética de distintas levaduras para que puedan aprovechar los dos principales monosacáridos generados en la hidrólisis (Matsushika y col., 2009, Harner y col., 2015).

Para la degradación completa de la hemicelulosa se requiere una batería de enzimas hemicelulasas que hidrolicen las ramificaciones y las cadenas principales del polímero. La última enzima en actuar es la  $\beta$ -xilosidasa, que hidroliza los dímeros y oligómeros solubles de xilosa. El caldo secretado por *M. thermophila* C1 es deficitario en actividad  $\beta$ -xilosidasa debido a la baja expresión de sus enzimas endógenas, por lo que en la hidrólisis de PCS con este cóctel enzimático, gran parte de la xilobiosa no es degradada a xilosa. Aproximadamente se libera un 50% del máximo teórico de xilosa mientras que otro 50% queda sin hidrolizar. En el caso de la glucosa se alcanzan niveles cercanos al 80% y la celobiosa residual prácticamente es despreciable (Figura 4.25). Estos valores de xilobiosa suponen una gran pérdida ya que se deja de utilizar en torno al 15% de los azúcares totales.



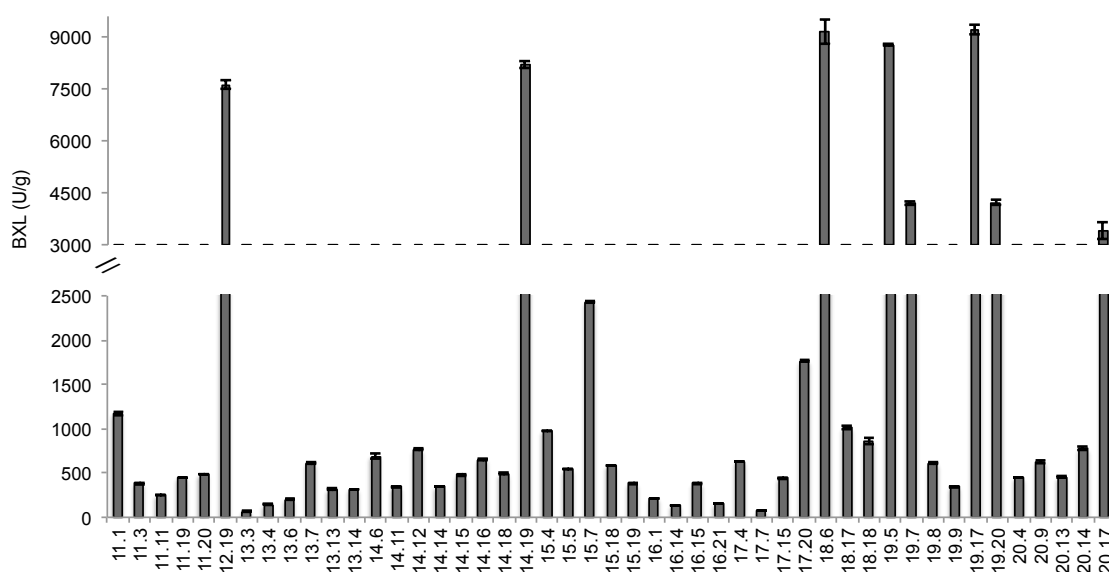
**Figura 4.25** Liberación de distintos azúcares en hidrólisis de PCS a 72h con el cóctel secretado por *M. thermophila* C1. Se representa el porcentaje de liberación respecto a un máximo teórico de los distintos azúcares.

Teniendo en cuenta la limitación del cóctel secretado por *M. thermophila* C1 en la degradación de la hemicelulosa, se planteó mejorar la calidad del mismo mediante la expresión de una  $\beta$ -xilosidasa que hidrolizase los dímeros y oligómeros de xilosa residuales de las hidrólisis. La estrategia seguida para la mejora de este cóctel

enzimático fue el escrutinio de distintas  $\beta$ -xilosidasas de otros hongos celulolíticos, la expresión heteróloga y la selección de un clon con alta expresión de una  $\beta$ -xilosidasa en *M. thermophila* C1.

#### 4.6.1 Escrutinio de $\beta$ -xilosidasas de hongos celulolíticos

Para la búsqueda de una proteína  $\beta$ -xilosidasa (Bxl) candidata a ser expresada en *M. thermophila* C1 se cultivaron 200 cepas de hongos celulolíticos en medio líquido, con el objetivo de llevar a cabo un escrutinio en busca de actividad  $\beta$ -xilosidasa (BXL) mediante ensayo de actividad con el sustrato análogo p-nitrofenil xilopiranosido (pNXP). De las cepas analizadas, 47 mostraron actividad  $\beta$ -xilosidasa significativa, por encima del control de *M. thermophila* C1 cuya actividad es 10 U/g de proteína. Para tener un valor comparable entre todas las cepas se calculó la actividad específica relativizada a la cantidad de proteína total secretada por cada una de ellas (Figura 4.26).

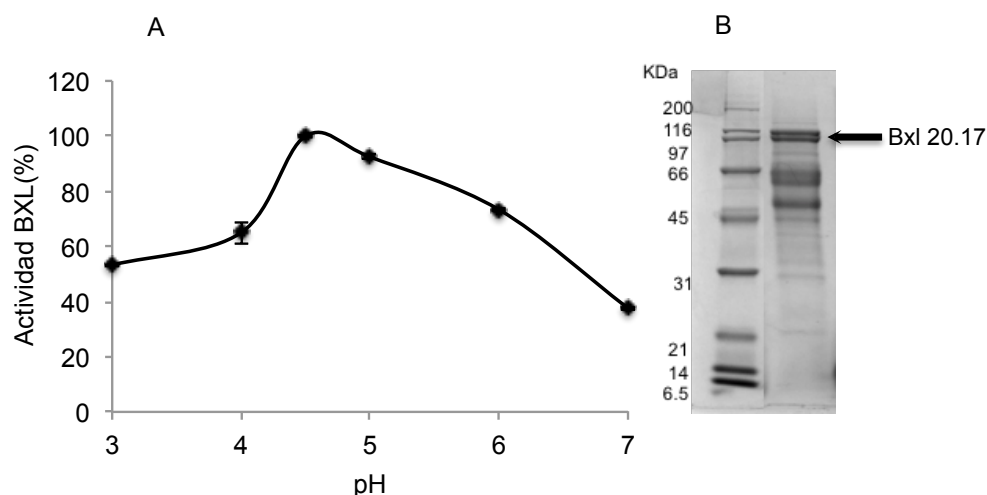


**Figura 4.26** Actividad específica BXL medida con pNXP del escrutinio de las mejores cepas de la colección de hongos celulolíticos. Se representa un corte en el eje Y para la correcta visualización de los valores.

La selección de la enzima a expresar en *M. thermophila* C1 se realizó en base a distintos factores:

- Alta actividad específica.
- Expresión de la enzima  $\beta$ -xilosidasa respecto al conjunto de proteínas secretadas observado en el perfil proteico.
- Termorresistencia en condiciones de proceso de hidrólisis enzimática: 50°C, pH 5,0 y 72h.
- pH óptimo comprendido entre el 4,5 y 5,5 por ser el pH de la hidrólisis.
- Cobertura de la identificación por huella peptídica.

Se escogió la enzima  $\beta$ -xilosidasa de la cepa 20.17 para continuar el estudio y comprobar si sería una buena candidata a expresar en *M. thermophila* C1 por sus propiedades. Siendo la actividad específica del cóctel superior a 3000 U/g y tras determinar que la actividad BXL de la cepa 20.17 era termorresistente a las condiciones de proceso, se procedió a realizar una curva de pH con el objetivo de determinar si la enzima era activa en el rango de pH en el que se produce la hidrólisis. Se observó que la actividad BXL de la cepa tiene un óptimo a pH 4,5 conservando un 90% de actividad a pH 5,0 y un 80% a pH 5,5 (Figura 4.27A).



**Figura 4.27** (A) pH óptimo de la actividad BXL de la cepa 20.17 a 50°C usando pNXP como sustrato. (B) Gel SDS-PAGE (12%) del caldo extracelular la cepa 20.17. Se indica con una flecha la banda correspondiente a la enzima Bxl 20.17.

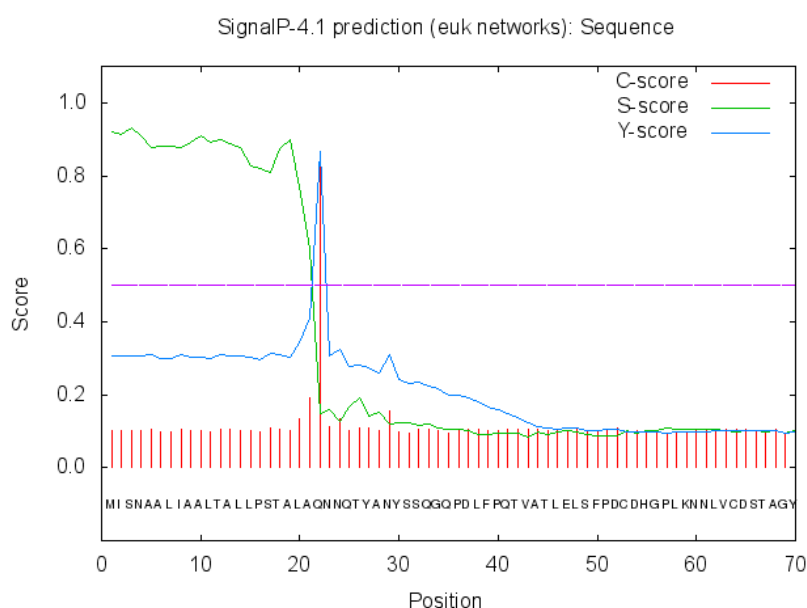
Para analizar el perfil proteico se llevó a cabo un gel SDS-PAGE del caldo secretado por la cepa 20.17 (Figura 4.27B), donde se observó que existían 5 bandas predominantes, por lo que la alta actividad específica BXL no era debida a la presencia de una única proteína mayoritaria secretada. Se recortaron las distintas bandas y se identificó la enzima  $\beta$ -xilosidasa 20.17 mediante huella peptídica. En el gel SDS-PAGE se indica con una flecha la banda correspondiente a la enzima  $\beta$ -xilosidasa presente en esta cepa.

#### 4.6.2 Amplificación del gen *bxl* 20.17

A partir de las secuencias de los péptidos obtenidos se realizó una búsqueda en las bases de datos, en la que se identificó una proteína perteneciente a la familia GH3 del género *Trichoderma*. En base a dichas secuencias se diseñaron los cebadores correspondientes para intentar obtener el gen mediante amplificación por PCR.

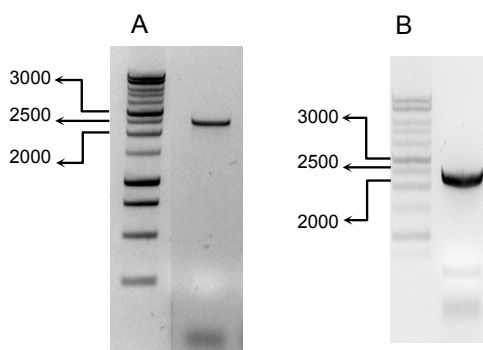
Para la expresión del gen *bxl* 20.17 se siguieron dos estrategias basadas en la mejora de la secreción de enzimas heterólogas por el uso de distintos péptidos señales (Zoglowek y col., 2015, Kanamasa y col., 2003). La primera estrategia fue el uso del péptido señal nativo de la proteína Bxl 20.17. Para la segunda estrategia el péptido señal nativo se substituyó por el péptido señal de la glucoamilasa de *Aspergillus*

*niger*. En hongos se ha demostrado que la fusión del péptido señal de la glucoamilasa de *A. niger* en el extremo amino de la proteína favorece dicha secreción (Gouka y col., 1997, Piumi y col., 2014). Para la sustitución de la secuencia del péptido señal, este se predijo mediante el programa SignalP. Como resultado de este análisis los parámetros C-score e Y-score tuvieron su máximo en el aminoácido 22, lugar que se asumió como inicio de la proteína madura, mientras que el parámetro S-score tuvo los máximos valores entre los aminoácidos 1 y 21, que constituirían el péptido señal. Por tanto, según la predicción del programa SignalP el sitio de corte del péptido señal se encontraba entre los aminoácidos 21 y 22 (Figura 4.28 ).



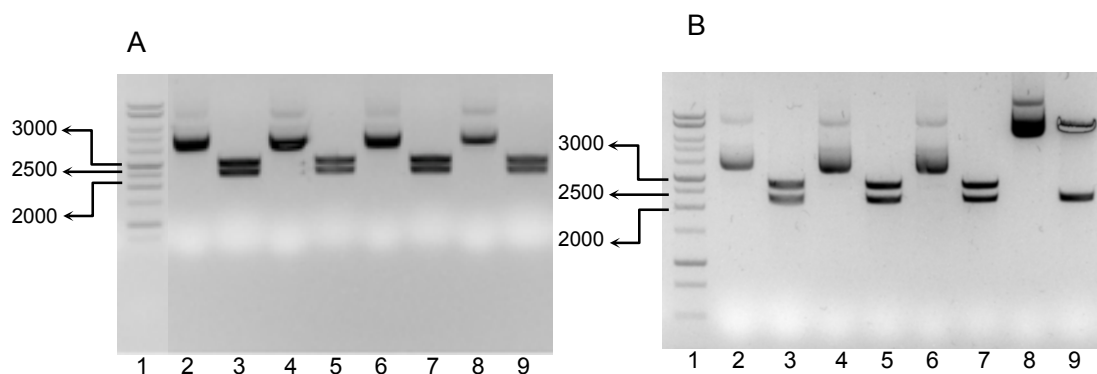
**Figura 4.28** Predicción del sitio de corte del péptido señal de la proteína Bxl 20.17 mediante el programa SignalP.

En base a esta predicción se diseñó un cebador directo, eliminando la secuencia del péptido señal nativo e incluyendo la secuencia del péptido señal de la glucoamilasa más una secuencia de 31 nucleótidos para conseguir una hibridación específica. Para la estrategia del uso del péptido señal nativo de la proteína se diseñó el cebador directo en base a la secuencia de la base de datos del gen *bxl* 20.17, del mismo modo que el cebador reverso, que fue común para ambas estrategias (véase Materiales y métodos apartado 3.10.2). Se realizó una PCR, con las condiciones descritas en materiales y métodos, usando el ADN genómico extraído de esta cepa 20.17 como molde. El tamaño del gen esperado era de 2385 pb y la PCR dio como resultado una amplificación específica de un fragmento de aproximadamente 2400 pb correspondiendo con el gen *bxl* 20.17 para ambas estrategias (Figura 4.29).



**Figura 4.29** Amplificación del gen *bxl 20.17*. (A) Versión con el péptido señal nativo. (B) Versión con el péptido señal de la glucoamilasa de *A. niger*.

Cada uno de los fragmentos obtenidos se clonaron en un vector de clonación comercial, pMBL-T, y se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Para confirmar la incorporación del gen *bxl 20.17* se escogieron 4 colonias de cada construcción y se realizó un análisis de restricción. Las digestiones mostraron la liberación del inserto con el tamaño esperado de aproximadamente 2400 pb y el vector de 2945pb (Figura 4.30). En el caso de la versión del gen con el peptido señal nativo todos los clones fueron positivos. Para la versión del gen *bxl 20.17* con el péptido señal de la glucoamilasa de *A. niger* 3 de los 4 clones analizados fueron positivos.

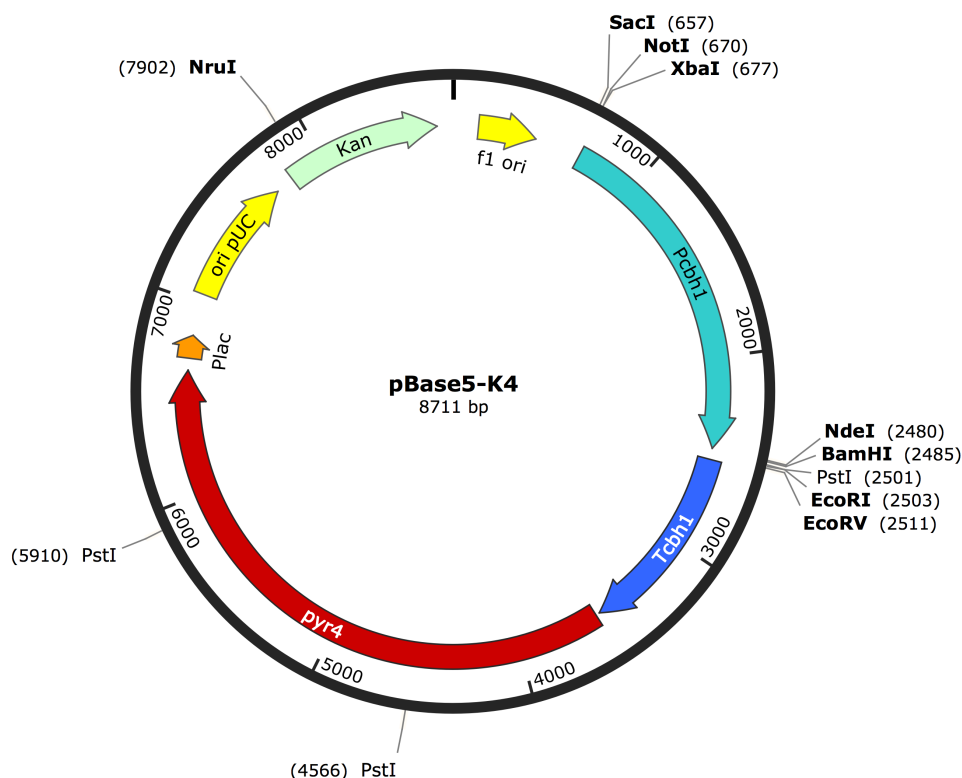


**Figura 4.30** Análisis de restricción con NdeI/BamHI de los vectores pMBL-T que incluyen el gen *bxl 20.17*. Calle 1: Marcador de peso molecular. Calles 2, 4, 6 y 8: pMBL-T::*bxl 20.17* sin digestión. Calles 3, 5, 7 y 9: pMBL-T::*bxl 20.17* digerido con NdeI/BamHI que libera el gen insertado. (A) Versión con el péptido señal nativo. (B) Versión con el péptido señal de la glucoamilasa de *A. niger*.

#### 4.6.3 Expresión del gen *bxl 20.17* en *Myceliophthora thermophila* C1

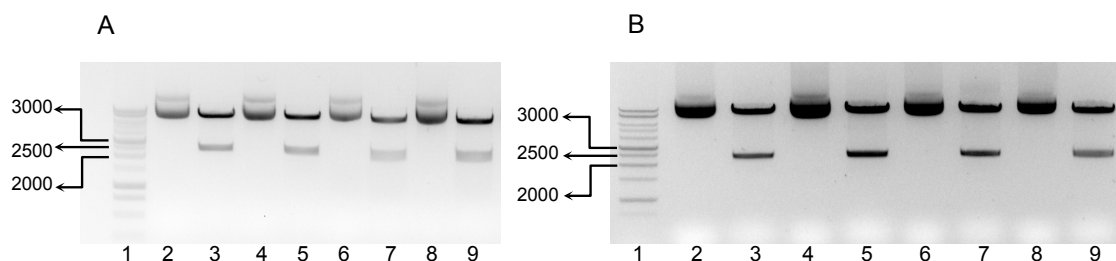
Para la expresión del gen *bxl 20.17* en *M. thermophila* C1 se utilizó el vector pBase5-K4 (Figura 4.31). Este vector cuenta con un casete que confiere resistencia a kanamicina, el promotor y terminador del gen *cbh1* de *M. thermophila*, entre los que se encuentra un sitio de policlonaje para la ligación directa de los genes a clonar. El promotor de *cbh1* posee alta expresión en *M. thermophila* (Ward, 2012). El vector incluye un marcador de selección por auxotrofia en el hongo, el gen *pyr4*. Este gen

codifica para la enzima oritidina 5'-monofosfato descarboxilasa, implicada en la ruta de síntesis de pirimidinas, catalizando la conversión de orotidina 5'-monofosfato a uridina 5'-monofosfato. Las cepas auxótrofas *pyr4* no crecen en medios de cultivo sin uracilo o uridina, pero la auxotrofia es fácilmente reversible por complementación (Sun X. y col., 2013).



**Figura 4.31** Vector de expresión pBase5-K4 para *Myceliophthora thermophila* C1.

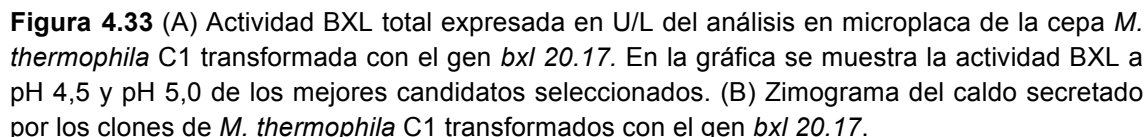
Un clon de cada construcción se subclonó entre los sitios NdeI y BamHI del sitio de policlonaje del vector de expresión pBase5-K4. Ambas construcciones se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Para confirmar la incorporación del gen en el vector se llevó a cabo una PCR de colonias con los cebadores propios de cada gen, seguida de un análisis por restricción (Figura 4.32). Todos los clones analizados fueron positivos.



**Figura 4.32** Análisis de restricción con NdeI/BamHI de los vectores de expresión pBase5-K4 que incluyen el gen *bxl* 20.17. Calle 1: Marcador de peso molecular. Calles 2, 4, 6 y 8: pBase5-K4::*bxl* 20.17 sin digestión. Calles 3, 5, 7 y 9: pBase5K4::*bxl* 20.17 digerido con NdeI/BamHI que libera el gen insertado. (A) Versión del gen con el péptido señal nativo. (B) Versión del gen con el péptido señal de la glucoamilasa de *A. niger*.



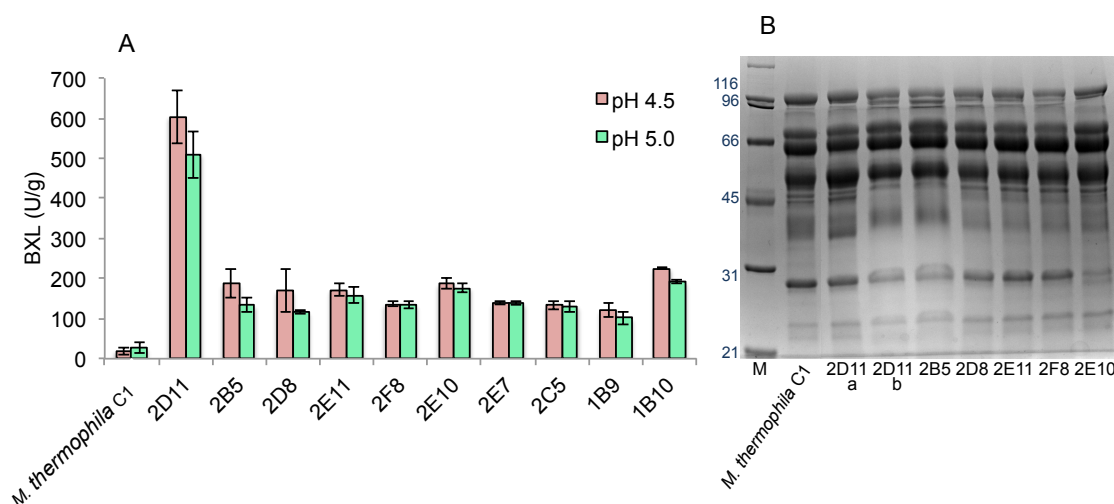
Adicionalmente, para reconfirmar la expresión de Bxl 20.17, se llevó a cabo un zimograma en geles de poliacrilamida utilizando como sustrato 4-metil umberiferil- $\beta$ -D-xilopiranosido (MUX) (Figura 4.33B). En la primera calle del zimograma, donde se cargó la cepa control, se observa una banda que corresponde a la enzima Bxl1 endógena de *M. thermophila* C1, mientras que en el resto de calles además de esta banda aparece una banda superior correspondiente a Bxl 20.17, lo que reconfirma la expresión de esta enzima por los clones transformantes de *M. thermophila* C1.



109

expresión suponga una disminución del resto de enzimas celulolíticas, que se traduzca en un aumento de dosis de cóctel enzimático para llegar a los niveles óptimos de rendimiento.

La producción de los distintos transformantes, al igual que el control sin transformar, se calculó en el rango de 1 a 2 g/L de proteína. La actividad BXL de los sobrenadantes de los 10 candidatos seleccionados se ensayó tanto a pH 4,5 como a pH 5,0 y se analizó el perfil proteico mediante gel SDS-PAGE (Figura 4.34). El clon 2D11 fue el que presentó mayor actividad específica, mostrando una banda diferencial a la altura de 90 kDa.

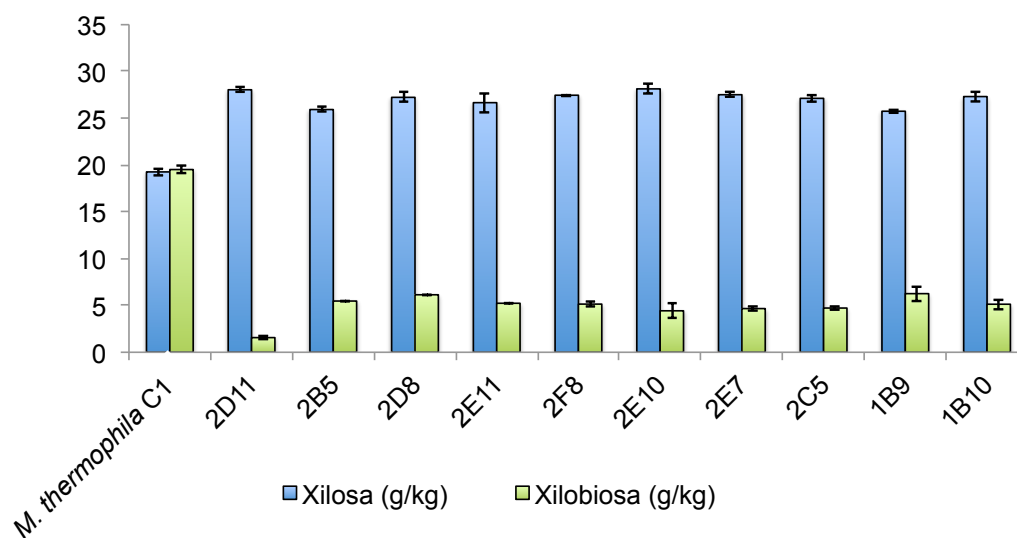


**Figura 4.34** Fermentación en matraz de los 10 candidatos seleccionados de *M. thermophila* C1 transformada con el gen *bxl* 20.17. (A) Actividad BXL específica de los sobrenadantes, expresada en U/g de proteína. Se representa la media de 3 repeticiones y las barras representan la desviación estándar. (B) Gel SDS-PAGE (12%) de los caldos secretados.

#### 4.6.4 Hidrólisis de PCS con los sobrenadantes de los clones transformantes de *Myceliophthora thermophila* C1

Con los sobrenadantes obtenidos en fermentación en matraz que contenían las proteínas secretadas por de los clones transformantes de *M. thermophila* C1 con el gen *bxl* 20.17, se llevó a cabo una hidrólisis enzimática con PCS como sustrato, con el objetivo de comprobar si estos transformantes conseguían hidrolizar una mayor cantidad de xilobiosa que la cepa control. La dosis utilizada tanto para el control sin transformar como para los transformantes fue de 10 mg de proteína por gramo de glucano.

Todos los candidatos seleccionados liberaron más xilosa que el control sin transformar. En 9 de los 10 clones quedaron aproximadamente 5 g/Kg de xilobiosa residual por degradar. En el caso del clon 2D11, coincidiendo con el clon que mayor actividad específica mostraba, se hidrolizó la totalidad de la xilobiosa, dejando valores no cuantificables por los métodos analíticos disponibles, y liberando un total de 28 g/Kg de xilosa (Figura 4.35). En el caso de la liberación de glucosa, ninguno de los transformantes alcanzaron los 58 g/L que liberó el control.



**Figura 4.35** Concentración de xilosa y xilobiosa a las 72h de hidrólisis del PCS usando cóctel enzimático de transformantes de *M. thermophila* C1 con el gen *bxl* 20.17. Los valores de xilosa y xilobiosa se representan en g/Kg de hidrolizado.



## **5 DISCUSIÓN**



## 5.1 La enzima Bgl1 frente a otras $\beta$ -glucosidasas

Tradicionalmente las  $\beta$ -glucosidasas han seguido dos criterios de clasificación basados en la especificidad de sustrato o en la identidad de la secuencia nucleotídica. Basándose en la especificidad de sustrato, estas enzimas se han clasificado como arilo  $\beta$ -glucosidasas, que actúan sobre arilo-glucósidos, verdaderas celobiasas, que hidrolizan celobiosa para liberar glucosa; y enzimas de amplia especificidad de sustrato, que actúan sobre un amplio espectro de sustratos. La mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas caracterizadas se encuentran en la última categoría (Singhania y col., 2013). Sin embargo, el método más aceptado de clasificación es por la identidad de la secuencia de aminoácidos, propuesto por Henrissat y Bairoch (1991), basado en las similitudes en la secuencia y en el plegamiento de estas enzimas. La mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas fúngicas pertenecen a la familia GH3, así como un gran número de enzimas provenientes de levaduras y bacterias. Es el caso de la enzima Bgl1 de *M. thermophila* C1, cuya secuencia consta de 870 aminoácidos que conforman un dominio N terminal de la familia GH3 (residuos 42-362), un dominio C terminal de la familia GH3 (residuos 394-666) y un dominio tipo fibronectina tipo III (residuos 792-860), dominios según InterProScan (Jones y col., 2014). Los primeros 19 aminoácidos corresponden a un péptido señal que dirige la proteína hacia la ruta de secreción, demostrando que es una proteína extracelular.

Como se puede observar en la Figura 5.1, la enzima Bgl1 conserva los residuos del sitio activo Arg165, Lys198, His199, Glu213, Met254, Asp289, Trp290 y Trp456, marcados en amarillo. Estos residuos han sido determinados por homología con otras enzimas  $\beta$ -glucosidasas, como la enzima de *Penicillium purpurogenum* KJS506 (Jeya y col., 2010). Los residuos catalíticos Asp289 y Glu518 se encuentran conservados (resaltados en rosa en la Figura 5.1), correspondiendo el primero al residuo que actúa como nucleofílico y el segundo, al que actúa de ácido/base. Estos residuos de la enzima Bgl1 han sido confirmados por Zhao y col. (2015) al ser mutados ambos de manera independiente por Ala y perder su actividad frente a pNGP.

La enzima Bgl1 es una glicoproteína. Como tal, presenta 11 posibles sitios de N-glicosilación según NetNGlyc 1.0 Server (Blom y col., 2004), no pudiendo determinarse en las condiciones de cultivo de este trabajo, la cantidad de Asn que se encuentran glicosiladas. Estas modificaciones son con alta probabilidad las causantes de la diferencia de tamaño teórico y experimental observado en esta tesis (Tabla 4.2). Zhao (2015) determinó la existencia de 5 sitios de O-glicosilación mediante NetOGlyc 4.0 sever (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), cuando expresó esta proteína de manera heteróloga en *Pichia pastoris*.

La secuencia de la enzima Bgl1 presenta una identidad del 82% con una GH3 de *Thielavia terrestris*, un 75% con la Bgl3A de *Humicola insolens* y un 66% con la Bgl de *Fusarium oxysporum* y una Bgl de la familia GH3 de *T. reesei*.

## Discusión

M_thermophila	--mkaa--alsclfgstla-----vagaIESRKVHQKPLARSEPFYPSWMNPADG	48
H_insolens	mrlyaaagwllistvsmttaNRHRQVIGRNHLNHHHRSQRELAYSPPSYPSWMDPKAAE	60
T_terrestris	mrlrsaagwllvlparssgl-----adKNSHQPLEKRTLATSEPFYPSWMNPADG	52
P_anserina	mkfsvv---vaaalasgal-----aTPQYPPKLIKRDAYSPPVYPSWMNPADG	48
F_oxysporum	mklnwvaalsigaagtdgTVLALASEVPGTLAGVKVTRDRLAHSPPHYPSWMDPNAIG	60
T_reesei	mk-----tlsvfaaallaavaea-----NPYPPPHSNQAYSPPFYPSWMDPSAPG	46
	: * * * * * : * *	
M_thermophila	WAEAYAQAQSFVSQMTLLEKVNLTGTVGWGAECVGVQVGAIPRLGLRSLCMHDSPLGIRG	108
H_insolens	WQNYAKAKAFVSKLTLEKVNLTGTVGWASEQCVGNTGVSVPRLGLRGLCLHDSPLGIRG	120
T_terrestris	WTEAYARAKEFVSQMTLLEKVNLTGTVGWAEQCVGVQVGAIPRLGLRSLCMQDSPLGVRG	112
P_anserina	WAEAYVKAREFVSQMTLLEKVNLTGTVGWASEQCVGVQVGAIPRLGLRSLCMHDAPLGIRG	108
F_oxysporum	WEEAYAKAKNFVSQMTLLEKVNLTGTVGWQGERCVGNVGSIPRLGMRGLCLQDGPLGIRL	120
T_reesei	WEQAYAQAQSFVSGLTLEKVNLTGTVGWMGEKCVGNVGTVPRLGMRSLCMQDGPLGLRF	106
	* :*: *: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
M_thermophila	ADYNSAFPSGQTVAAATWDRGLMYRRGYAMGQEAQKGINVLLGPVAGPLGRMPEGGRNWE	168
H_insolens	SDYNSAFPSGQTTAATFDRILMYRRGYAMGKEAKGKGINVLLGPVAGPLGRMPAAGRNWE	180
T_terrestris	TDFNSGFPSGQTAATFDRGLIYRRGYAMGQEAQKGINVLLGPVAGPLGRAPTGGGRNWE	172
P_anserina	TDYNSAFPSGQTAATWDRQLMYRRGYAIGKEAKGKGINVLLGPVAGPLGRMPAAGRNWE	168
F_oxysporum	SDYNSAFPAQTAGASWSKSLWYERGLLMTGTEFKGKIDIALGPATGPLGRTAAGGRNWE	180
T_reesei	NTYNSAFSVGLTAAASWSRHLWVDRGTALGSEAKGKGVVDLLGPVAGPLGRNPNNGGRNVE	166
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
M_thermophila	GFAPDPVLTGIGMSETIKGIQDAGVIACAKHFIGNEQEHFRQVPEAQGYGYNISETLSSN	228
H_insolens	GFSPDPVLTGVMGAETIKGIQDAGVACAKHFIGNEQEHFRQAGE--DYGFNITEALSSN	238
T_terrestris	GFSPDPVLTGVMGAESIKGIQDAGTIACAKHFIGNEQEHFRQVPEAQGYGFNISEALSSN	232
P_anserina	GFSPDPVLTGVMGAETVKGHDAGVIACAKHFIGNEQEHFRQVPEAQGYGFNISETLSSN	228
F_oxysporum	GFTVDPYPMAGHAMAEAVKGIQDAGVIACAKHYIANEQEHFRQSGEVQSRKYNISESLSSN	240
T_reesei	GFGSDPYLAGLALADTVTGIQNAGTIACAKHFLNEQEHFRQVPEANGYGPITEALSSN	226
	** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
M_thermophila	IDDKTMHELILWPFADAVRAGVGSVMCSYQQVNNSYACQNSKLLNDLLKNELGFGGFFVMS	288
H_insolens	IDDKTMHELILWPFVDAVRAGVGSVMCAYTQVNNSYSCQNSYLLNLLKNELGFGGFFVMS	298
T_terrestris	IDDKTLHELILWPFADAVRAGVGSVMCSYQQVNNSYSCQNSKLLNGLLKNELGFGGFFVMS	292
P_anserina	IDDKTMHELILWPFADAVRAGAGSFMCYQQVNNSYGCQNSKLMNGLLKDELGFGGFFVMS	288
F_oxysporum	LDDKTLHELILWPFADAVRAGVGSVMCSYNQINNSYGCQNSKLLNGLLKDEMFGGFFVMS	300
T_reesei	VDDKTIHEVYGWPFQDAVKAGVGSIMCSYNQVNNSYACQNSKLLNGLLKKEEYFGGFFVMS	286
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
M_thermophila	DWQAQHTGAASAVAGLDMSMPGDTQFNTGVSFWGANLTLAVLNGTVPAYRLDDMAMRIMA	348
H_insolens	DWQAQHTGAASAVAGLDMSMPGDTTFNTGVSFWGANLTLAVLNGTVPRYRIDDMAMRIMA	358
T_terrestris	DWQAQHTGAASAVAGLDMTMPGDTFNTGVSFWGANLTLAVLNGTVPAYRIDDMAMRIMA	352
P_anserina	DWQAQHTGAASAVAGLDMSMPGDTFNTGVSFWGTNLTAVLNGTVPAYRIDDMAMRIMA	348
F_oxysporum	DWAAQHTGAASAVAGLDMSMPGDTAFDSGYSFWGGNLTAVLNGTVPAWRVDDMALRIMS	360
T_reesei	DWQAQHTGVASAVAGLDMTMPGDTAFNTGASVFGSNLTLAVLNGTVPEWRIDDMVMRIMA	346
	* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
M_thermophila	ALFKVTKTTD-LDPINFSTWTDTYGPIHWAQKQGYQFINSHVDVRADHGNLIREIAAKG	407
H_insolens	AFFKVDHDIH-LDPVNFSTWTRQTYGPHWRAGDGYQQVNFHVDVREDHLLIREIAAKG	417
T_terrestris	AFFKVNKDIK-LDPINFSTWTLDTYGPIHWAQKQGYQFINSHVDVRADHGNLIREIAAKG	411
P_anserina	AFFKVEKSIK-LDPINFSTWLDTYGPIHWAAGEGHQQINSHVDVRADHGNLIREIAAKG	407
F_oxysporum	AFFKVGKSVDELDPINFSTWTRDTFGFVQTFQENREQVNFVGVNQHDKHNHIREIAAKG	420
T_reesei	PFFKVGKTVDSLIDTNFSDTWGTYGYVQAQVNFVGVNQHDKHNHIREIAAKG	406
	: * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
M_thermophila	TVLLKNTGSLPLNPKPFVAVIGEDAGSSPNGPNCSDRGCEGTLMGWSGTANYPYLV	467
H_insolens	TVLLKNTGGLPLKPKFIAVIGDDAGPNPNCSDRGCEGTLMGWSGTANFPYLI	477
T_terrestris	TVLLKNTGSLPLKPKFLAVIGEDAGPNTSGPNSCSDRGCEGTLMGWSGTANFPYLV	471
P_anserina	TVLLKNTGSLPLNPKPFVAVIGEDAGPNPNCSDRGCEGTLMGWSGTANFPYLI	467
F_oxysporum	SVILKNTGSLPLNPKFLAVIGEDAGPNPNCSDRGCEGTLMGWSGTANFPYLI	480
T_reesei	TVIFKNNGILPLKPKFLVIGEDAGPNPNCSDRGCEGTLMGWSGTANFPYLV	466
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
M_thermophila	SPDAALQARAIQDGTTRYESVLSNYAEKTKALVSQANATAIVFNADSGEGYINVDGNEG	527
H_insolens	TPDAALQARALRDGTTRYESVLTNYALEKTETLVSQANATAIVFNADSGEGYTRVDGNEG	537
T_terrestris	TPDAALQAQALQDGSRYESILSNYATSQIKALVSQANVTIAIVFNADSGEGYINVDGNEG	531
P_anserina	TPDAALQAQAIKDGSRYESILTNYAASQTRALVSQDNVTIAIVFNADSGEGYINFEQNEG	527
F_oxysporum	TPDQGLQNRAAQDGTTRYESILTNNEAQQTALVSQPNVTIAIVFNADSGEGYIEVDGNFG	540
T_reesei	TPDAALQSQALQDGTTRYESILSNYASQQTALVSQPDATIAIVFANSDSGEGYINVDGNEG	526
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
M_thermophila	DRKNLTLWNGDGLVKNVSSWCSNTIVVIHSGVPVLLTDWYDNPNTAILWAGLPGQESG	587
H_insolens	DRKNLTLWNGDGLIKNVSSWCSNTIVVIHSGVPVLLTDWYNSPNNTAILWAGLPGQESG	597
T_terrestris	DRKNLTLWKDGDALVKNVASWCSNTIVVIHSGVPVLLTEWYNSPNNTAILWAGLPGQESG	591
P_anserina	DRNNLTLWRGGDGLVKNVSSWCSNTIVVIHSGVPVLISEWYDNPNTAILWAGLPGQESG	587
F_oxysporum	DRKNLTLWQQGDELIKNVSSICPNTIVVLHTVGPVLLADYEKNPNNTAILWAGLPGQESG	600
T_reesei	DRKNLTLWKNGDDLIKTVAAVNPNTIVVIHSGVPVILKDYANHPNNTAILWAGAPQESG	586
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	



**Figura 5.1** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la enzima Bgl1 de *M. thermophila* C1 con  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH3 realizado con el programa Clustal Omega (Sievers y col., 2011). La secuencia en minúscula resaltada en gris son los péptidos señal de las proteínas predichos por el programa SignalP 4.1 (Petersen y col., 2011). Los residuos conservados que forman el sitio activo se encuentran resaltados en amarillo mientras que los residuos catalíticos conservados en la familia GH3 se encuentran resaltados en rosa. En verde se representa una secuencia del dominio catalítico encontrada en la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH3. Los residuos de asparragina susceptibles de ser glicosilados, predichos por el programa NetNGlyc 1.0 Server (Blom y col., 2004), se encuentran marcados en negrita. Números de acceso: *M. thermophila* XP\_003663420.1; *H. insolens* AMQ75895.1; *T. terrestris* XP\_003655388.1; *Podospora anserina* XP\_001907699.1; *F. oxysporum* EWZ43800.1; *T. reesei* XP\_006965281.1.

**Figura 5.1** Alineamiento de la secuencias de aminoácidos de la enzima Bgl1 de *M. thermophila* C1 con  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH3 realizado con el programa Clustal Omega (Sievers y col., 2011). La secuencia en minúscula resaltada en gris son los péptidos señal de las proteínas predichos por el programa SignalP 4.1 (Petersen y col., 2011). Los residuos conservados que forman el sitio activo se encuentran resaltados en amarillo mientras que los residuos catalíticos conservados en la familia GH3 se encuentran resaltados en rosa. En verde se representa una secuencia del dominio catalítico encontrada en la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas de la familia GH3. Los residuos de asparragina susceptibles de ser glicosilados, predichos por el programa NetNGlyc 1.0 Server (Blom y col., 2004), se encuentran marcados en negrita. Números de acceso: *M. thermophila* XP\_003663420.1; *H. insolens* AMQ75895.1; *T. terrestris* XP\_003655388.1; *Podospora anserina* XP\_001907699.1; *F. oxysporum* EWZ43800.1; *T. reesei* XP\_006965281.1.

Las enzimas  $\beta$ -glucosidasas han sido ampliamente estudiadas en la literatura debido a su gran valor en la industria como elemento final en la ruta de degradación de la celulosa, pudiendo llegar a ser el cuello de botella del proceso debido a inhibición por producto de la propia degradación de la celulosa (Sørensen y col., 2013).

Han sido extensamente caracterizadas  $\beta$ -glucosidasas de géneros como *Aspergillus* (Kitpreechavanich y col., 1986) o *Trichoderma* (Chauve y col., 2010) por su aplicación comercial.

### 5.1.1 Constantes cinéticas de las $\beta$ -glucosidasas

La enzima Bgl1 de *M. thermophila* sido previamente caracterizada por Zhao y col. (2015), nombrada como Bgl3b. Los datos presentados previamente no son comparables a los descritos en esta tesis ya que se utilizó para la caracterización cinética el sustrato análogo pNGP, en lugar del sustrato natural celobiosa. Además, la enzima fue expresada de manera heteróloga en la levadura *P. pastoris*, por lo que las modificaciones postraduccionales de la enzima son significativamente distintas, ya que esta levadura produce proteínas con la mayoría de sus sitios de N-glicosilación modificados con entre 8 y 14 residuos de manosa (Grinna y Tschopp 1989). El efecto de la glicosilación de las celulasas ha sido ampliamente estudiado, demostrando que esta modificación postraducciona aporta multiplicidad, estabilidad y modifica la actividad de las enzimas tanto frente a sustratos análogos como a sustratos naturales (Juturu y col., 2014, Dotsenko y col., 2016).

Otras enzimas  $\beta$ -glucosidasas de *M. thermophila* han sido caracterizadas previamente. Karnaouri y col. (2013) expresaron la enzima MtBgl3a en *P. pastoris* cuya  $K_m$  para la celobiosa fue de 2,64 mM, muy similar a la obtenida en este trabajo. Roy y col. (1991) purificaron una  $\beta$ -glucosidasa extracelular de *M. thermophila* cuya  $K_m$  para la celobiosa fue de 8,0 mM, dentro del mismo orden de magnitud que la Bgl1. La Tabla 5.1 resume constantes cinéticas de  $\beta$ -glucosidasas producidas por otros hongos encontradas en la bibliografía. La afinidad que presentan estas enzimas por la celobiosa es muy variada, encontrado enzimas con gran afinidad como la Bgl de *H. insolens* u otras que muestran menos afinidad por este sustrato, como la BglA de *Thermotoga neapolitana*, cuya  $K_m$  es dos ordenes de magnitud mayor que la de la primera.

Se estudió la inhibición producida por la glucosa en la enzima Bgl1 utilizando celobiosa como sustrato. La inhibición resultó ser competitiva, fenómeno muy común en la inhibición de las  $\beta$ -glucosidasas por glucosa (Saha y col., 1996). La  $K_i$  para la glucosa fue de 0,71 mM, similar a la enzima  $\beta$ -glucosidasa de *Penicillium brasilianum* o la  $\beta$ -glucosidasa de *A. niger* del cóctel comercial Novozym-188 (Tabla 5.1). No existen más datos de constantes inhibitorias debido a que la mayoría de los autores utilizan el sustrato análogo pNGP para calcularlas.

**Tabla 5.1** Comparativa de constantes cinéticas de distintas enzimas  $\beta$ -glucosidasas usando celobiosa como sustrato.

Organismo	Enzima	$V_{max}$ (U/mg)	$K_m$ (mM)	$K_i$ glucosa (mM)	Referencia
<i>M. thermophila</i> C1	Bgl1	1666	2	0,71	Presente trabajo a
<i>M. thermophila</i>	MtBgl3a	-	2,64	-	Karnaouri y col., 2013 b
<i>A. fumigatus</i> Z5	nBgl3	52,37	1,75	-	Liu y col., 2012 a
<i>A. orizae</i> CBS 12559	HGT-BG	353	7	-	Riou y col., 1998 a
<i>A. niger</i>	Novozym-188	-	0,35	1,6	Krogh y col., 2010 a
<i>T. thermosaccharolyticum</i>	BGL	120	7,9	-	Pei y col., 2012 b
<i>T. neapolitana</i>	rBglA	-	66,6	-	Park y col., 2005 b
<i>P. brasilianum</i>	rBgl	28	1,58	1,1	Krogh y col., 2010 b
<i>M. purpureus</i> NRRL1992	$\beta$ G	4,71	2,86	-	Daroit y col., 2010 a
<i>T. reesei</i>	BglI	43,5	2,1	-	Chen y col., 1992 a
<i>T. reesei</i>	BglII	9,8	11,11	-	Chen y col., 1992 a
<i>H. insolens</i>	Bgl	86	0,51	-	Souza y col., 2010 a
<i>F. palustris</i>	BGL	-	4,81	-	Yoon y col., 2007 a
<i>Phoma</i> sp. KCTC11825BP	BGL	-	3,2	-	Choi y col., 2011 a

(a) Enzima  $\beta$ -glucosidasa purificada del caldo de cultivo. (b) Enzima  $\beta$ -glucosidasa expresada de manera heteróloga en bacterias o levaduras.

La hidrólisis del pNGP mediada por la enzima Bgl1 evidencia una desviación del modelo de Michaelis-Menten mediante un comportamiento bifásico en el que a altas concentraciones de sustrato se observa cierta inhibición (Figura 4.3). Este comportamiento ha sido previamente descrito por otros autores como Daroit y col. (2008) o Krogh y col. (2010). Además de la hidrólisis de los enlaces glucosídicos, algunas enzimas  $\beta$ -glucosidasa pueden catalizar simultáneamente la síntesis reversa o transglucosilación a altas concentraciones de sustrato. La hidrólisis del enlace glucosídico mediante mecanismo de retención, expuesto en la introducción (Apartado 1.5), forma inicialmente un complejo glicosil covalente con la enzima. Este intermediario se descompone en la segunda etapa de la reacción, lo que se puede producir mediante una molécula de agua (actividad hidrolítica) o mediante un azúcar aceptor (actividad de transglucosilación). En la reacción de transglucosilación más sencilla, el aceptor es el propio sustrato. Esta reacción inhibe la hidrólisis de manera proporcional con un incremento de la concentración de sustrato. Por lo tanto la transglucosilación puede emular la inhibición por sustrato en las reacciones de hidrólisis de enlace glucosídico por mecanismo de retención (Bohlim y col., 2013).

Debido a la desviación del modelo de Michaelis-Menten que presenta esta enzima no se calcularon las constantes cinéticas. Sin embargo podemos afirmar que la enzima Bgl1 muestra una mayor actividad en la hidrólisis del pNGP que en la hidrólisis de la celobiosa. Como se adelantó en la introducción, muchas de las enzimas  $\beta$ -glucosidasas caracterizadas muestran este comportamiento debido a que la cinética de las  $\beta$ -glucosidasas depende de la configuración del sustrato y para la hidrólisis de la celobiosa se requiere un cambio conformacional que no es necesario para la hidrólisis del pNGP (Nam y col., 2010).

### 5.1.2 Termoestabilidad de las $\beta$ -glucosidasas

Muchos autores afirman haber descubierto enzimas  $\beta$ -glucosidasas termoestables, sin embargo normalmente los ensayos a altas temperaturas están hechos exclusivamente durante cortos periodos de tiempo (Yeoman y col., 2010). La hidrólisis de biomasa lignocelulósica a nivel industrial requiere de 3 a 5 días y para el propósito de este proyecto el proceso se encuentra optimizado a 72h. Por lo tanto, resulta imprescindible que las enzimas utilizadas no pierdan actividad durante el transcurso del proceso. Más evidente aun si cabe, es el caso de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, ya que al ser la última enzima en actuar en la hidrólisis de la celulosa, la pérdida de actividad debida a las condiciones de pH y temperatura pueden suponer un cuello de botella en la sacarificación, no llegándose a obtener los niveles de glucosa objetivo.

Tras los ensayos realizados en esta tesis se puede afirmar que la enzima Bgl1 es termoestable en las condiciones del proceso, haciéndola una candidata idónea para su uso (Figura 4.5B). Previamente Zhao y col., (2015) observaron cierto grado de termoestabilidad de esta enzima hasta 60°C, sin embargo y tal y como se ha mencionado, los ensayos fueron realizados tan sólo a un máximo de 120 min, tiempo insuficiente para demostrar la termoestabilidad de la enzima en hidrólisis de biomasa lignocelulósica. Otra  $\beta$ -glucosidasa de *M. thermophila*, MtBgl3a, tan sólo resiste a 50°C durante 60 min a pH 6,5, disminuyendo su actividad hasta un 50% tras 240 min de incubación (Karnaouri y col., 2013). Existen datos reportados de  $\beta$ -glucosidasa de otros hongos: la GH3 de *P. brasilianum* es termoestable durante 24 h a 60°C en un rango de pH de 4 a 6 (Krogh y col., 2010); una  $\beta$ -glucosidasa extracelular del hongo basidiomiceto *Fomitopsis palustris* resultó ser termoestable entre 45 y 55°C hasta 50 h de incubación (Yoon y col., 2008).

La termoestabilidad de las enzimas puede ser medida también según su temperatura de fusión ( $T_m$ ). Para ello, la enzima se incuba a distintas temperaturas durante cortos periodos de tiempo y se realiza un ensayo para determinar la actividad residual de la misma. Según este método, la enzima Bgl1 es estable hasta los 60°C, obteniéndose una  $T_m$  de 69°C (Figura 4.5A). La  $\beta$ -glucosidasa extracelular de *A. niger* es termoestable hasta los 55°C, mientras que su  $T_m$  es de 59°C (Yan y col., 1997). La Bgl3 de *Aspergillus fumigatus* Z5, tanto la producida por el hongo como la recombinante, mantiene la totalidad de su actividad tras la incubación hasta los 50°C, siendo su  $T_m$  de 70 y 73°C respectivamente (Liu y col., 2012). En este caso, parece ser que la glicosilación producida por el hospedador en la enzima Bgl3 recombinante aporta mayor termoestabilidad frente a la producida por el propio hongo.

### 5.1.3 Efecto de la temperatura y el pH en la actividad de las $\beta$ -glucosidasas

En los resultados obtenidos en esta tesis se muestra que la enzima Bgl1 tiene su máximo de actividad entre 50°C y 60°C reduciendo dicha actividad a partir de los 65°C (Figura 4.5C). Sin embargo, Zhao y col. (2015) establecen un óptimo de temperatura para esta enzima de 50 a 65°C. Esta alteración probablemente sea debida a las modificaciones postraduccionales sufridas en la expresión heteróloga de la enzima en *P. pastoris*, en concreto a la glicosilación que este organismo produce. Ya se comentó anteriormente casos en los que se evidencian diferencias en el comportamiento de una enzima expresada de manera heteróloga frente a la expresada por su propio hospedador (Liu y col., 2012). Karnouri y col. (2013) expresaron de manera heteróloga en levadura la Bgl3a de *M. thermophila*, obteniendo una temperatura óptima de 70°C. Parece lógico pensar que un mismo organismo cuente con distintas enzimas que realicen una misma función dentro de condiciones distintas, de manera que pueda adaptarse a distintos ambientes. No obstante, habría que confirmar estos resultados con la enzima expresada en *M. thermophila*.

Dentro del rango de temperaturas óptimas de la enzima Bgl1 se encuentran la  $\beta$ -glucosidasa del hongo *Aspergillus oryzae* (50°C, Riou y col., 1998), la de *A. fumigatus* expresada en *P. pastoris* (60°C, Liu y col., 2012), la  $\beta$ -glucosidasa intracelular de *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58 (50°C, Nakkharat y col., 2006) o de *Candida peltata* (50°C, Saha y col., 1996). Por debajo de esta temperatura óptima se encuentran las  $\beta$ -glucosidasas de *Aspergillus ochraceus* (40°C, Asha y col. 2016), del hongo filamentoso *Termitomyces clypeatus* (45°C, Pal y col., 2010) o la de *Debaryomyces vanrijae* (40°C, Belancic y col., 2003). Sin embargo existen otro grupo de enzimas que proviene de organismos hipertermófilos cuya temperatura óptima está comprendida por encima de los 70°C, como es el caso de la  $\beta$ -glucosidasa de bacteria marina *T. neapolitana* expresada en *E. coli* (95°C, Park y col., 2005).

Para el proceso industrial de hidrólisis de biomasa lignocelulósica es preferible la utilización de enzimas de organismos termófilos. La utilización de enzimas termotolerantes en el proceso de hidrólisis permite la aplicación de altas temperaturas de reacción. Estas altas temperaturas aportan numerosas ventajas dado que las enzimas derivadas de hongos termófilos tienen mejores capacidades hidrolíticas que las enzimas derivadas de hongos mesófilos, como mayor velocidad de reacción y tiempos de incubación reducidos (Berka y col., 2011; Singh y col., 2014). El uso de altas temperaturas también reduce el riesgo de contaminación, reduce la viscosidad de sustrato y mejora la transferencia de masa. También las enzimas termófilas pueden ser conservadas por periodos de tiempo prolongados a temperatura ambiente. Por último pierden menos actividad durante el proceso a alta temperatura frecuentemente usados en el pretratamiento de los materiales crudos. El amplio rango de temperatura óptima de la enzima Bgl1 permitiría incluso una posible subida de la temperatura de hidrólisis en beneficio de las mejoras mencionadas.

El pH óptimo de la enzima Bgl1 fue 5,0, manteniendo hasta un 80% de su actividad entre pH 4,5 y 6,0 y reduciendo significativamente su actividad por encima y por debajo de estos valores (Figura 4.5D). Previamente Zhao y col. (2015) publicaron datos de esta enzima expresada de manera heteróloga en *P. pastoris*, donde se determinaban el mismo pH óptimo obtenido en este trabajo, pero se aumentaba su rango de pH, alcanzando un 70% de su actividad a pH 3,5. Como se ha observado con anterioridad, esta diferencia se explicaría por las distintas modificaciones postraduccionales de la enzima que protejan su estructura a pH ácidos. El comportamiento de esta enzima coincide con otras  $\beta$ -glucosidasas de *M. thermophila*, como la enzima Bgl3a también expresada de manera heteróloga en la levadura *P. pastoris* (Karnaouri y col., 2013). La mayoría de las enzimas  $\beta$ -glucosidasas fúngicas caracterizadas encuentran su máximo de actividad entre pH 4,5 y 6,0. En la bibliografía encontramos distintos ejemplos: la enzima Bgl3A de *Penicillium funiculosum* NCL1, una proteína extracelular con un pH óptimo entre 4,0 y 5,0 (Ramani y col., 2012); una  $\beta$ -glucosidasamicelar de *H. insolens* con un pH óptimo desplazado a zonas más básicas entre 6,0 y 6,5 (Souza y col., 2010); una proteína intracelular de *T. clypeatus* cuyo pH óptimo es 5,0 (Pal y col., 2010); o la  $\beta$ -glucosidasas recombinante expresada en *P. pastoris* de *T. reesei* con un pH óptimo de 5,0 (Chen y col., 2011).

La elección de una enzima Bgl con una temperatura y pH óptimos desplazados hacia los establecidos en las condiciones de proceso de hidrólisis de biomasa lignocelulósica siempre resultará en un beneficio en el coste del proceso, ya que la enzima trabajará a máximo rendimiento, pudiendo de esta manera disminuir la cantidad de enzima necesaria. Además, estas características de las enzimas supondrán una ventaja frente a otras con pH óptimos desplazados a zonas más básicas o temperaturas más bajas, pues por normal general los pretratamientos de biomasa lignocelulósica incluyen altas temperaturas y pH ácido. En concreto, el rastrojo de maíz utilizado en este trabajo se trata con explosión de vapor y 1% de  $H_2SO_4$ . La temperatura y el pH alcanzados por la biomasa han de ser corregidos antes de añadir la enzima para evitar la desnaturalización de la misma. De manera que enzimas resistentes pueden permitir acortar tiempo del proceso global combinando las etapas de pretratamiento e hidrólisis.

## 5.2 Las enzimas Cbh1 y Cbh4 frente a otras celobiohidrolasas

La actividad catalítica de las enzimas celobiohidrolasas consiste en la hidrólisis de los enlaces  $\beta(1,4)$  del glucano de forma procesiva partiendo de extremos libres de las cadenas de celulosa liberando como principal producto celobiosa y en menor proporción celotriosa y otros oligómeros superiores. Estas enzimas llevan a cabo la hidrólisis de las zonas más cristalinas de los polímeros de celulosa. Principalmente pertenecen a dos familias de glicosil hidrolasas, GH6 y GH7. Las celobiohidrolasas tipo I (EC 3.2.1.176), pertenecientes a la familia GH7, actúan sobre los extremos reductores de las cadenas de celulosa, mientras que las celobiohidrolasas tipo II (EC



3.2.1.91), de la familia GH6, actúan sobre los extremos no reductores, siendo así complementarias para la degradación eficiente de la celulosa (Payne y col., 2015). Como se adelantó en la introducción, existe una diferencia en cuanto al mecanismo de acción de ambos grupos, ya que las enzimas de la familia GH7 actúan mediante un mecanismo de retención mientras que las enzimas pertenecientes a la familia GH6 el mecanismo de acción es por inversión.

*M. thermophila* C1 secreta al menos cuatro celobiohidrolasas diferentes codificadas por distintos genes. Dos de ellas pertenecen a la familia GH6, mientras que las otras dos pertenecen a la familia GH7. De las cuatro celobiohidrolasas secretadas por *M. thermophila* C1, dos de ellas poseen una estructura que incluye tan sólo por un módulo catalítico mientras que las otras dos se componen de un módulo catalítico, un péptido de unión y un dominio de unión a carbohidratos. Es el caso de las celobiohidrolasas caracterizadas en esta tesis, las enzimas Cbh1 y Cbh4, identificadas por Gusakov y col. (2007) como CBHIa y CBHIb respectivamente. En el conjunto total de proteína secretada por *M. thermophila* C1 hasta un 40% de la proteína son celobiohidrolasas de tipo I y II. La mayoría de los hongos más estudiados, como el caso de *T. reesei* o *H. insolens* tan sólo secretan dos celobiohidrolasas (Cel7A y Cel6A) (Foreman y col., 2003, Schülein y col., 1997), mientras que existen casos excepcionales como el hongo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* que produce al menos siete celobiohidrolasas diferentes (Covert y col., 1992).

En primer lugar se purificó y caracterizó la enzima Cbh1 de *M. thermophila* C1, la cual consta de 526 aminoácidos. Como ya determinaron Gusakov y col., (2005) los 17 primeros residuos representan el péptido señal, correspondiendo del aminoácido 18 al 455 al dominio catalítico, del 456 al 490 al conector y por último del 491 al 526 al dominio de unión a celulosa tipo I. Como se puede observar en el alineamiento de la Figura 5.2, los residuos más importantes se encuentran conservados en las enzimas de la familia GH7. Es el caso de los residuos catalíticos Glu230 y Glu235, que son los residuos nucleófilo y ácido/base respectivamente. Además existe un tercer residuo ácido, Asp232, responsable de mantener la correcta posición y estado de protonación de Glu230 mediante la formación de puentes de hidrógeno entre ambos residuos (Payne y col. 2015). Por homología con otras secuencias se han encontrado cuatro triptófanos conservados en la familia que forman un anillo para la interacción con los residuos glucosídicos del glucano. Son los aminoácidos Trp55, Trp57, Trp388 y Trp397, marcados en amarillos en la Figura 5.2. La secuencia cuenta con un único posible sitio de N-glicosilación en Asn288. En el caso de la O-glicosilación se predicen 6 posibles sitios dentro del dominio catalítico según NetOGlyc 4.0 Server (Julenius y col., 2005): Ser213, Thr264, Thr420, Thr421, Ser422 y Thr450, además de múltiples sitios en el péptido de unión.

```

M_thermophila      -----myakfatl-aalvagaaaQNACTLTAENHPSLTWSKCTSGGSCSTSVQGSITI 51
P_chrysosporium    -----mfrtatllaftmaamvfqQQVGTNTARSHPALTSQKCTKSGGCSNLNTKIVL 52
T_versicolor       -----mfptaalslsfvaiaaygQQVGTTLTAESHPKLSVQOCTAGGSCSTLQRSVVL 52
T_reesei           -----myrklaivi-saflataraQSACTLQSETHPPLTWQKCSSGGTCTQQTGSVVI 51
P_occitanis        msalnsfnyksalil-gsllatagaQQIGTYTAETHPSLSWSTCKSGGSCSTNSGAIITL 59
P_canescens        mkgsvsyqiykgalll-sallgsvqgQQVGTLATETHPALTSKCTAGGSCSTVSGSVVI 59
T_emersonii        -----mlrralllssailavkaQQAGTATAENHPPLTWQECTAPGSCTTQNGAVVL 52
T_aurantiacus      -----myqrallf-sfflaaaraHEAGTVTAENHPSLTWQOCSGGSCSTTQNGKVI 51
                    :      :      . . . * :..** *: . * . * *: :.:

M_thermophila      DANWRWTHRTDSATNCEYEGNKWDTSYCSGDPSCASKCCIDGADYSSTYGITTSGNLSNLK 111
P_chrysosporium    DANWRWLHSTSGYTNCYTGNQWDATLCPDGKTCANALDGDADYTGTYGITASGSSSLKLQ 112
T_versicolor       DSNWRWLHDVSGSTNCTYGTNTWDATLCPDPTTCAANALDGDADYTGTYGITTSGNELNLK 112
T_reesei           DANWRWTHATNNSNCTYDGNWSTSLCPDNETCAKNCCLDGAAYASTYGVTTSGNSLSIG 111
P_occitanis        DANWRWVHGVTNTNCTYGTNTWNSAICDTDASCAQDCALDGDADYSGTYGITTSGNLSRLN 119
P_canescens        DANWRWVHSTSGSTNCTYGTNTWDATLCPDDKTCATNCAVDGASYASTYGVTTSGNSLRIN 119
T_emersonii        DANWRWVHDVNGYTNCTYGTNTWDPTYCPDDETCAQNCALDGDADYEGTYGVTTSSGSSKLK 112
T_aurantiacus      DANWRWVHTTSGYTNCYTGNWDTSLCPDDVTCAQNCALDGDADYSGTYGVTTSGNALRLN 111
                    *:**** * .. **** * * . : *      **: .*:*** * .***:***. * :

M_thermophila      FVTGQYSTNIGSRITYLMES-DTKYQMFQLLNEFTFDVDVSNLGCGLNGALYFVSMAD 170
P_chrysosporium    FVTG----SNVGSRVYLMAD-DTHYQMFQLLNEFTFDVDMSNLPCGLNGALYLSAMDAD 167
T_versicolor       FVTDGQYSTNIGSRVYLLSDDDSTYEMFNLNQEFTFDVDMSNLPCGLNGALYFVEMDSD 172
T_reesei           FVTQSA-QKNVGARLYLMAS-DTTYQEFTLLGNEFSFDVDVSQLPCGLNGALYFVSMAD 169
P_occitanis        FVT----GSNVGSRTYLMAD-NTHYQIFDLNQEFTFTVDVSHLPCGLNGALYFVTMDAD 174
P_canescens        FVTTAS-QKNIGSRLYLLEN-DTTYQKFNLLNQEFTFDVDVSNLPCGLNGALYFVMDAD 177
T_emersonii        FVT----GSNVGSRLYLLQD-DSTYQIFKLLNREFSFDVDVSNLPCGLNGALYFVAMDAD 167
T_aurantiacus      FVTQSS-GKNIGSRLYLLQD-DTTYQIFKLLGQEFTFDVDVSNLPCGLNGALYFVAMDAD 169
                    ***      .*:*** **: . : : * * * .*:** *:*. * *****: **:*

M_thermophila      GGMSKYSNGKAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFINGEANVENWQSSSTNDANAGTGKYGCCSE 230
P_chrysosporium    GGMAYPTNKGAKYGTGYCDSQCPRDLKFINGEANVEGWNNAT--SANAGTGNYGTCCTE 225
T_versicolor       GGASRFPTNKGAKYGTGYCDTQCPHDIKFINGEANVLGWEGSASDPNAGSGQYGTCCNE 232
T_reesei           GGVSKYPTNTAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFINGQANVEGWEPSSNNANTGIGGHGSCCSE 229
P_occitanis        GGVSKYPNNKAGAQYGVGYCDSQCPRDLKFIAQANVEGWTPSANNANTGIGNHGACCAE 234
P_canescens        GGMAYPTNKGAKYGTGYCDSQCPRDLKFINGQANVEGWTPSKNDVNSGIGNHGSCCAE 237
T_emersonii        GGVSKYPNNKAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFIDGEANVEGWQPSNNANTGIGDHGSCCAE 227
T_aurantiacus      GNLSKYPGNKAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFINGQANVEGWQPSANDPNAGVGNHGSSCAE 229
                    *      :.: * .*:***:***:***:***:*** * * * : . *:* * :*:.* *

M_thermophila      MDVWEANNNMAAFTPHPCPTVIGQSRCEGDSGGTYSTDRYAGICDPDGCDFNSYRQGNKT 290
P_chrysosporium    MDIWEANNDAAAYTPHPCTTNAQTRCSGSDCT-----RDTGLCDADGCFNSFRMGDQT 279
T_versicolor       MDIWEANQNGAAVTPHVCSTQTRCEGTDCGD--GDERYDGLCDKDCDFNSFRMGDQT 290
T_reesei           MDIWEANSISEALTTPHPCPTTVQGEICEGDCGGTYSDNRYGGTCDPDGCDWNPYRLGNTS 289
P_occitanis        LDIWEANSISEALTTPHPCDTPGLSVCTTDACGGTYSSDRYAGTCDPDGCDFNYPYRLGVT 294
P_canescens        MDIWEANSISNALTTPHPCDTPGQTMCTGDACGGTYSSNRYGGTCDPDGCDFNYPYRQGATS 297
T_emersonii        MDVWEANSISNAVTPHPCDTPGQTMCSGDDCGGTYSDNRYAGTCDPDGCDFNYPYRMGNTS 287
T_aurantiacus      MDVWEANSISTAVTPHPCDTPGQTMCGDDCGGTYSSSTRYAGTCDPDGCDFNYPYQPNHNS 289
                    :*:****. . * * * * . * * * * * * * * * * *: *

M_thermophila      FYGKGM--TVDTTKKITVVTFQLKN---SAGELSEIKRFYVQNGKVIPNSESTIPGVE-G 344
P_chrysosporium    FLGKGL--TVDTSKPFTVVTFITNDGTSAGTLTEIRRLYVQNGKVIQNSSVKIPGIDPV 337
T_versicolor       FLGLGK--TVDTSQKFVVTFVTADNTTSGALSEIRRLYVQGGKVIANSKTNIAGMTDY 348
T_reesei           FYGPGSSFTLDTTKKLTVVTFQFETS-----GAINRYVQNGVTFQPPNAELGSYS-G 340
P_occitanis        FYGSGK--TVDTTKPFTVVTFQVNTDGTSTGSLSEIRRYVQNGVVIQPPSSKISGIS-G 351
P_canescens        FYGPGL--TVDTKSPFTVVTFITNDGTSSGTLSEIKRFYVQNGKVIQPPQSTIVGNT-G 354
T_emersonii        FYGPGK--IDTTKPFTVVTFQFLTDDGTDGTLSEIKRFYIQNSNVIQPPNSDISGVT-G 344
T_aurantiacus      FYGPGK--IVDTSSKFTVVTFITDDGTPSGTLTEIKRFYVQNGKVIQSESTISGVT-G 346
                    * * *      :*. . . :***** . * * * * * . . : . . : .

M_thermophila      NSITQDWCDRQKAAGFDVTDQDKGGMVQMGKALAGPMVLVMSIWDDHAVNMLWLDSTWP 404
P_chrysosporium    NSITDNFCSQQKTAFGDTNRYFAHQHGLKQVGEALRTGMVLALSIIWDDYANMLWLDSDYP 397
T_versicolor       DSITDDFCNAQKQAFGDTNTFEKLGGLTEMGAAFEKGMVLVMSIWDDHEANMLWLDSDYP 408
T_reesei           NELNDDYCTAEAEAFGGS-SFSDKGLTQFKKATSGGMVLVMSLWDDYYANMLWLDSTYP 399
P_occitanis        NVINSYCAAEISTFGGTASFNKHGGLTNMAAGMEAGMVLVMSLWDDYAVNMLWLDSTYP 411
P_canescens        NSITDAFCKAQKTAFGDLDDFTKHGAMAGMGAGFDDGMVLVMSLWDDHASNMLWLDSTYP 414
T_emersonii        NSITTEFCTAQKQAFGDTDDFSQHGLLAKMGAAQQGMVLVMSLWDDYAAQMLWLDSDYP 404
T_aurantiacus      NSITTEYCTAQKAAGDNTGFTHGGLQKISQALAQGMVLVMSLWDDHAANMLWLDSTYP 406
                    : . . :* : * * * * . : . . * * .*:***: ***** :*

```



M_thermophila	IDGA-GKPGAERGACPTTSGVPAEVEAEAPNSNVIFSNIIRFGPIGSTVSGLPDGGSGNPN	463
P_chrysosporium	TNKDPSTPGVARGTCATTSGVPAQIEAQSPNAYVVFVSNIKFGDLNTTYTGTVSSSSSVSSS	457
T_versicolor	TDADPSSPGVARGPCPASSGVPTDVESQSANANVAFVSNIKFGPIGSTYA-----	457
T_reesei	TNETSSTPGAVRGSCSTSSGVPAQVESQSPNAKVTFVSNIKFGPIGSTGNP--SGGNPPGG	457
P_occitanis	TNAT-GTPGAARGTCATTSGDPKTVESQSGSSVYTFSDIRVGFNFSTFSGGSSTGGSTTT	460
P_canescens	TNATSTTPGAKRGTCDISSGDPATVESTYANSYVVYSNIKTGPLNSTFTGSGTGGSSSSS	474
T_emersonii	TDADPTTPGIARGTCPTDSGVPSDVESQSPNSYVYTSNIKFGPINSTFTAS-----	455
T_aurantiacus	TDADPDTPGVARGTCPTTSGVPADVESQNPNSYVIYSNIKVGPINSTFTAN-----	457
	: .** ** * ** * :*: .: * :*: * : : *	
M_thermophila	PPVSSSTPVPSSST----TSSGSSGPTGGTGVAKHYEQCGGIGFTGPTQCESPYTCTKLN	519
P_chrysosporium	HSSTSTSS-----SHSSSTPPTQPTGVTPQWQCGGIGYTGSTTCASPYTCHVLN	509
T_versicolor	-----	457
T_reesei	NRGTTTTR-----RPATTTG-SSPGPTQSHYQCGGIGYSGPTVCASGTTTCQVLN	506
P_occitanis	TASR--TT-----TTSASSTSTSTSTGTGVAGHWGQCGGQGTGPTTCVSGTTCTVNV	522
P_canescens	TTITTKTTTSTKTTTSSSTSTTTSSGSGSTGAAHWAQCGGNGWTGPTTCVSPYVCTKSN	534
T_emersonii	-----	455
T_aurantiacus	-----	457
M_thermophila	DWYSQCL	526
P_chrysosporium	PYYSQCY	516
T_versicolor	-----	457
T_reesei	PYYSQCL	513
P_occitanis	PYYSQCL	529
P_canescens	DWYSQCL	541
T_emersonii	-----	455
T_aurantiacus	-----	457

**Figura 5.2** Alineamiento de la secuencias de aminoácidos de la enzima Cbh1 de *M. thermophila* C1 con celobiohidrolasas de la familia GH7 realizado con el programa Clustal Omega (Sievers y col., 2011). La secuencia en minúscula resaltada en gris son los péptidos señal de las proteínas predichos por el programa SignalP 4.1 (Petersen y col., 2011). Resaltado en azul se representa en dominio de unión a carbohidratos. Las secuencias de aminoácidos en verde representan en conector. Los residuos conservados en la familia GH7 se resaltan en amarillo, mientras que los residuos catalíticos están resaltados en rosa. En la secuencia de Cbh1 de *M. thermophila* los residuos de asparragina suceptibles de N-glicosilación se encuentran marcados en negrita al igual que los de serina y treonina suceptibles de O-glicosilación. Números de acceso: *M. thermophila* XP\_003660789.1; *P. chrysosporium* P13860.1; *Trametes versicolor* XP\_008038849.1; *T. reesei* P62694; *Penicillium occitanis* ATT99321.1; *Penicillium canescens* AIL95870.1; *Talaromyces emersonii* AAL33603; *Thermoascus aurantiacus* AAL83303.1

Esta proteína tiene un tamaño teórico de 55 kDa, sin embargo su tamaño experimental fue de 64 kDa. Este aumento de tamaño, así como las diferentes isoformas observadas en la electroforesis en dos dimensiones, se pueden deber a las modificaciones postraduccionales de la enzima, en concreto a la glicosilación. Existe un sitio de N-glicosilación en el dominio catalítico de la proteína, Asn271, sin embargo no fue posible eliminar los azúcares de forma enzimática, posiblemente por la necesidad de enzimas específicas que hidrolicen los enlaces de las manosas y N-acetil glucosaminas.

La secuencia de la enzima Cbh1 de *M. thermophila* C1 presenta una identidad del 66% con una celobiohidrolasa de *T. aurantiacus*, del 62% con la CBHIA de *T. emersonii*, del 60% con las celobiohidrolasas de *P. canescens* y *T. versicolor* y del 58% con las enzimas Cel7A de *T. ressei* y *P. occitanis*.

En segundo lugar se purificó y caracterizó la enzima Cbh4 de *M. thermophila* C1, cuya secuencia está formada por 482 aminoácidos: los 17 primeros aminoácidos corresponden al péptido señal, del 30 al 62 se encuentra el dominio de unión a carbohidratos tipo 1 y del 124 al 482 el dominio catalítico perteneciente a la familia GH6, dominios según Superfamily (Gough y col., 2001). Entre ambos dominios se encuentra una secuencia rica en serina y treonina que se asume que es el conector flexible. La secuencia de la enzima Cbh4 tiene conservados los residuos con mayor relevancia de la familia GH6. Por homología con otras secuencias de la familia se asume que el residuo catalítico que actúa como ácido/base es el Asp258. El Asp212 ayudaría a mantener el estado de protonación del Asp258. Respecto al residuo nucleófilo los autores no se ponen de acuerdo, existiendo dos candidatos principales: Asp300 y Asp437 (Payne y col., 2015), resaltados en verde en la Figura 5.3. Otros residuos se encuentran resaltados en amarillo por participar en la unión a sustrato. La enzima tiene un posible sitio de N-glicosilación en Asn173 según NetNGlyc 1.0 Server (Blom y col., 2004), y cinco posibles sitios de O-glicosilación en el dominio catalítico, Ser149, Ser356, Thr416, Ser440 y Ser443 según NetOGlyc 4.0 Server (Julenius y col., 2005). El aumento de tamaño experimental de esta enzima frente al teórico, de aproximadamente 19 kDa (Tabla 4.8), es probablemente debido a la ocupación de estos sitios de glicosilación junto con el péptido de unión O-glicosilado, tal y como demostraron Gusakov y col. (2008) en otras proteínas secretadas por esta misma cepa donde el polisacárido más frecuente era (Man)<sub>3</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>.

La secuencia de la enzima Cbh4 tiene un alto grado de identidad con otras celobiohidrolasas de la familia GH6. La mayor identidad la comparte con *T. terrestris* con un 75%, seguida de *Neurospora crassa* con un 73%, *T. reesei* con un 64% y *A. fumigatus* y *Penicillium decumbens* con un 61%.

**Figura 5.3** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la enzima Cbh4 de *M. thermophila* C1 con celobiohidrolasas de la familia GH6 realizado con el programa Clustal Omega (Sievers y col., 2011). La secuencia en minúscula resaltada en gris son los péptidos señal de las proteínas predichos por el programa SignalP 4.1 (Petersen y col., 2011). Resaltado en azul se representa el dominio de unión a carbohidratos. Las secuencias de aminoácidos en verde representan en conector. Los dominios fueron predichos por Superfamily (Gough y col., 2001). Los residuos conservados en la familia GH6 presuntamente implicados en la unión a sustrato se remarkan en amarillo. Los residuos catalíticos confirmados están remarcados en rosa mientras que los hipotéticos se resaltan en verde. En la secuencia de Cbh4 de *M. thermophila* los residuos de asparagina susceptibles de N-glicosilación se encuentran en negrita al igual que los de serina y treonina susceptibles de O-glicosilación. Números de acceso: *A. fumigatus* Z5 KMK58671.1; *P. decumbens* ADX86895.1; *T. reesei* ADC83999.1; *N. crassa* OR74A XP\_960770.1; *T. terrestris* NRRL 8126 XP\_003648546.1.

## Discusión

```

M_thermophila -makklfitaalaaavlaAPVIEERQNCGA VWTQCGGNWQGP TCASGSTCVAQNEWYS 59
A_fumigatus mkhla-----ssialtlllpavqa QQT VVGQCGGQGWSGPTSCVAGAACSTLNPYYA 52
P_decumbens -mqrt-----sawalllllaqiata QQT VVGQCGGIGYSGPTSCVAGSSCSTQNSYYA 51
T_reesei -mivgilttlatlatlaasVPLEERQ ACSSVVGQCGGQNWSGPTCCASGSTCVYSNDYY 59
N_crassa maakllllaaaltasalaAPVLEDRQ NCSSAWSQCGGIGWSGATCCSSGNSCVCINSYY 60
T_terrestris -maqllllaaalaasalaAPVVEERQNCGS VWSQCGGIGWSGATCCASGNTCVELNPYY 59
               ::                :.* **** :.* *.* :.* :.* :.*:

M_thermophila QCLPNSQVTSSTTPSSSTTSQRSTSTSSSTT-RSGSSSSSTTPPPVSSPVT SIPGGATS 118
A_fumigatus QCI PGATATSTTLTTT-----TAATTT-----SQT-----TKPTTTGPTTSAP 91
P_decumbens QCLPGSGNGGGGAATTTT TAGQTKTMTATTT-----TSTK-----TSAGSGGSTTAP 101
T_reesei QCLPGAASSSSSTRAASTTSRVSPTTS-----RSSSATPPPGSTTTTRVPVPGSG 108
N_crassa QCLPGAQVTTTAGASSTSPSTSKVSSTTSKVTSSAAQPI TTTTAPSVP TTTIAGGASS 120
T_terrestris QCLPNSQVTTSTSKTTSTTTT RSST-TSHSSG-PTSTSTTTTSSPVVTPPST SIPGGASS 117
               **:* :                ::                .                :                :

M_thermophila TASYSGNPFSGVRLFANDY YRSEVHNLAIP SMTGT LAAKASAVA EVPSFQWLD RNVITDT 178
A_fumigatus TVTASGNPFSGYQLYANPY YSEVHTLAMP SLPSSLQPKASAVA EVPSFVWLD VAA-KVP 150
P_decumbens PASNSGNPFKGYQPYVNPYY ASEVQSLAIP SLAASLAPKASAVA KVP SFVWLD TAA-KVP 160
T_reesei TATYSGNPFVGVPWANAY YASEVSSLAIP SLTGAMATAAAAVAKVP SFMWLD TLT-DKTP 167
N_crassa TASFTGNPFLGVQGWANSY YSEIYNHAIP SMTGSLAAQASAVA KVP TFQWLD RNVITDT 180
T_terrestris TASWSGNPFSGVQMWANDY YASEVSSLAIP SMTGAMATKAAEVAKVP SFQWLD RNVITDT 177
               . : :**** * :.* ** ** : . * : : : : : * : : : : : * : : : : :

M_thermophila LMVQTL SQVRLN KAGANPPYAAQLVY DLPDRD CAAAASNGEFSIANGGAANYRSYIDA 238
A_fumigatus TMGTYLADIQAKN KAGANPPYAGIFVY DLPDRD CAALASNGEYSIANGGVANYKYIDA 210
P_decumbens TMGTYLADIKAKNAAGANPPYAGIFVY DLPDRD CAALASNGEYSIANGGVANYKYIDS 220
T_reesei LMEQTLADIR TANKNGGN--YAGQFVY DLPDRD CAALASNGEYSIADGGVAKYKNYIDT 225
N_crassa LMKSTLEEIRAANKAGANPPYAAHFVY DLPDRD CAAAASNGEFSIANGGVANYKTYINA 240
T_terrestris LFAHTLSQIRAANKAGANPPYAGIFVY DLPDRD CAAAASNGEFSIANGGAANYKTYIDA 237
               : * : : : * * . * . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

M_thermophila IRKHIEYS DIRIILVIEP D SLMANMVTNMNVAKCSNAASTYHELT VYALKQLNLPNVAMY 298
A_fumigatus IRAQLVKYSDVHTILVIEP D SLANLVTNLNVAKCANASAYLECDYALKQLNLPNVAMY 270
P_decumbens IRAQLVKYSDVHTILVIEP D SLANLVTNMNVAKCSGAHDAYLECTDYALKQLNLPNVAMY 280
T_reesei IRQIVVEYS DIRTLLVIEP D SLANLVTNLGT PKCANASAYLECIYAVTQLNLPNVAMY 285
N_crassa IRKLLIEYS DIRTILVIEP D SLANLVTN TNVAKCANASAYRECTNYAITQLDLPVHAQY 300
T_terrestris IRSLVIQYSDIRIIFVIEP D SLMANMVTNMNVAKCANAE STYKELTVYALQQLNLPNVAMY 297
               ** : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

M_thermophila LLA-----GHAGWLGWPANI QPAELFAGIYNDAGKPAAVRGLATNVANYNAWSIASAPS 353
A_fumigatus LADTNSSGHAGWLGWPANL GPATLFAKVYTDAGSPA AVRGLATNVANYNAWSLSTCPS 330
P_decumbens LLA-----GHAGWLGWPANIGPAADLFASVYKNAGSPA AVRGLATNVANYNAWSISTCPS 335
T_reesei LLA-----GHAGWLGWPANQDPAAQLFANVYKNASSPRALRGLATNVANYNGWNITSPPS 340
N_crassa LLA-----GHAGWLGWPANI QPAATLFAIDYKAAGKPKSVRGLVTNVSNYNGWSLSSAPS 355
T_terrestris LLA-----GHAGWLGWPANI QPAANLFAEIYTSAGKPA AVRGLATNVANYNGWSLATPPS 352
               *** ** : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

M_thermophila YTS PNP NYDEKHYIEAFSPLLNSAGFPA-RFIVDTGRNGKQPTGQQQWGDWCNVKGTGFG 412
A_fumigatus YTGDPNCDEKKYINAMAPLLKEAGFDA-HFIMDTSRNGVQPTKQNAWGDWCNVIGTGFG 389
P_decumbens YTQGDQNCDEKRYINALAPLLRANGFDA-HFIMDTSRNGVQPTKQNAWGDWCNVIGTGFG 394
T_reesei YTQGNVYNEKLYIHAIGPLL ANHGWSNAFFITDQGRSGKQPTGQQQWGDWCNVGTGTGFG 400
N_crassa YTT PNP NYDEKHYIEAFSPLLNAAGFPA-QFIVDTGRSGKQPTGQIEQGDWCNAIGTGFG 414
T_terrestris YTQGDPNYDESHYVQALAPLLTANGFDA-HFITDTSRNGKQPTGQRQWGDWCNVIGTGFG 411
               ** : : : . * : . : . : . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

M_thermophila VRPTANTGHELVD AFVWVKPGGESDGTSDTSAARYDYHCGLSDALQPAPEAGWFOAYFE 472
A_fumigatus VRPSTNTGDPLQDAFVWVKPGGESDGTSNSTSPRYDAHCGYSDALQPAPEAGTWFOAYFE 449
P_decumbens TPFTTDTGDALQDAFVWVKPGGESDGTSDTSSPRYDAHCGYSDALKPAPEAGTWFOAYFE 454
T_reesei IRPSANTGDSLLDSFVWVKPGGESDGTSDSSAPRFD SHCALPDALQAPAQAGAWFOAYFV 460
N_crassa VRPTTNTGSSLADAFVWVKPGGESDGTSDTSATRYDYHCGLSDALKPAPEAGWFOAYFE 474
T_terrestris VRPTTNTGLDIEDAFVWVKPGGESDGTSNSTSPRYDYHCGLSDALQPAPEAGTWFOAYFE 471
               : : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

M_thermophila QLLTNANPPF- 482
A_fumigatus QLLTNANPSF- 459
P_decumbens QLLVNANPSF- 464
T_reesei QLLTNANPSFL 471
N_crassa QLLKNANPAF- 484
T_terrestris QLLTNANPPF- 481
               *** **** *

```

### 5.2.1 Caracterización de las enzimas Cbh1 y Cbh4

Aunque existe mucha información bioquímica acerca de las celobiohidrolasas de tipo I y II pertenecientes a las familias GH6 y GH7, la comparativa resulta dificultosa debido a la gran cantidad de ensayos y sustratos que se utilizan. Atendiendo a la afinidad de la enzima por el sustrato soluble pNCB, se observa que la enzima Cbh1 es similar en esta propiedad a las encontradas en la bibliografía, manteniéndose la  $K_m$  en casi todos los casos en el mismo orden de magnitud. El valor de  $K_m$  se encuentra dentro de mismo rango que el que determinaron previamente Gusakov y col. (2005). En cuanto a la inhibición, la  $K_i$  para la celobiosa se encuentra dentro del mismo rango que otras celobiohidrolasas, mostrando una inhibición competitiva. En este caso, el valor de  $K_i$  no coincide con el determinado por Gusakov y col. (2005), aumentando en dos órdenes de magnitud (Tabla 5.2). Teniendo en cuenta que las diferentes condiciones de cultivo varían las modificaciones postraduccionales de las enzimas y éstas a sus vez las propiedades de las mismas (Stals y col., 2004), se puede achacar la diferencia en la constante de inhibición a condiciones de cultivo distintas en el trabajo de Gusakov y esta tesis.

**Tabla 5.2** Constantes cinéticas usando pNCB como sustrato de distintas enzimas celobiohidrolasas fúngicas de la familia GH7 purificadas de caldo de cultivo

Organismo	Enzima	$V_{max}$ (U/mg)	$K_m$ (mM)	$K_i$ celobiosa (mM)	Referencia
<i>M. thermophila</i> C1	Cbh1	0,09	0,63	1,25	Este trabajo
<i>C. lucknowense</i> *	CBHI	-	0,16	0,09	Gusakov y col., 2005
<i>T. reesei</i>	CBHI	-	0,06	0,05	Gusakov y col., 2005
<i>P. canescens</i>	PcCel7A	-	1,0	-	Volkov y col., 2014
<i>T. emersonii</i>	CBH IA	159,7	2,1	2,5	Tuhohy y col., 2002
<i>T. emersonii</i>	CBH IB	28,4	0,8	0,18	Tuhohy y col., 2002
<i>P. chrysosporium</i>	CBH I	-	0,38	0,065	Igarashi y col., 1998
<i>T. viride</i>	CBH I	-	0,03	-	Igarashi y col., 1998
<i>P. purpurogenum</i>	CBH	11,9	1,1	-	Lee y col., 2011
<i>T. versicolor</i>	TvCel7a	1	0,58	0,49	Lahjouji y col., 2007
<i>P. occitanis</i>	CBHI	-	1	2	Liman y col., 1995
<i>P. occitanis</i>	CBHII	-	5	No inhibición	Liman y col., 1995

\**M. thermophila* previamente clasificada como *Chrysosporium lucknowense*

Aunque los datos con el sustrato soluble pNCB resultaron útiles para hacer la comparativa de las constantes cinéticas de las celobiohidrolasas tipo I (las de tipo II no son activas frente a este sustrato) se decidió hacer una caracterización con un sustrato polimérico (Avicel), más parecidos al sustrato real. El motivo que nos llevó a caracterizar estas enzimas con Avicel es que los pequeños oligómeros que se suelen usar como sustratos análogos no son fiables para una buena caracterización por no comportarse de la misma manera que los sustratos poliméricos, al no participar en su actividad fenómenos como la procesividad de la enzima. Diferentes autores ha

observado diferencias de comportamiento cuando se usa un sustrato soluble frente a un sustrato polimérico, como Voutilainen y col. (2007) que manifestó que el mutante termoestable de la enzima Cel7B de *Melanocarpus albomyces* más activo frente a sustratos solubles era el menos activo en la hidrólisis de Avicel. Además se ha demostrado que dichos sustratos poliméricos estabilizan la enzima, no así los sustratos solubles. Por ejemplo, previamente Voutilainen y col. (2008) observaron que la enzima Cel7A de *Chaetomium thermophilum* tenía una  $K_m$  relativamente alta con sustratos solubles, pero no se estabilizaba muy bien con sustratos poliméricos respecto a otras enzimas, lo que indica que el comportamiento puede variar notablemente de un tipo de sustrato a otro.

Para la enzima Cbh1 de *M. thermophila* se determinó una  $V_{max}$  de 286 U/g utilizando Avicel como sustrato, frente a las 91 U/g cuando se usó pNCB. Esto demuestra que la enzima es más activa sobre sustratos poliméricos (Tabla 5.3). Los valores de actividad específica obtenidos por Gusakov y col. (2007) son similares, aun llevando a cabo condiciones de ensayo distintas en cuanto a concentración de sustrato y temperatura.

Prestando atención a la enzima Cbh4 de *M. thermophila* C1 observamos que no es activa frente a sustratos solubles como el pNCB, por lo que no se pudo caracterizar con este sustrato, dificultando su estudio comparativo con otras enzimas celobiohidrolasas de la familia GH6 presentes en la bibliografía. Atendiendo exclusivamente a la comparativa con la enzima Cbh1, se concluye que la Cbh4 tiene una  $V_{max}$  con Avicel como sustrato claramente superior de 833 U/g frente a 286 U/g de la Cbh1. Sin embargo, siendo más activa la enzima Cbh4, también es menos afín por este sustrato como demuestra su mayor  $K_m$  (26 g/L de la Cbh4 frente a 10 g/L de la Cbh1). Contradiendo las afirmaciones de Voutilainen y col. (2007) que indica que las celobiohidrolasas en general no suelen tener un comportamiento que se ajuste al modelo de Michaelis-Menten con sustratos poliméricos, las enzimas Cbh1 y Cbh4 se ajustaron perfectamente a dicho modelo en su caracterización con Avicel como sustrato. Al igual que con la enzima Cbh1, el valor de actividad específica para la Cbh4 obtenidos por Gusakov y col. (2007) es semejante a pesar de las distintas condiciones de ensayo. Atendiendo a este parámetro, la Cbh4 se posiciona como una de las celobiohidrolasas de la familia GH6 más activas, tan sólo por detrás de la enzima CBHII de *T. emersonii* cuya actividad es excepcionalmente alta, y la enzima Cel6A de *Neocallimastix patriciarum*.

Ninguna de las dos celobiohidrolasas caracterizadas ha mostrado ser inhibida por glucosa, fenómeno frecuente en otras celobiohidrolasas, aunque con excepciones como la enzima TrCel6A de *T. reesei* donde la glucosa resulta ser un inhibidor no competitivo (Teleman y col., 1995). Analizando la inhibición producida por la celobiosa se determinó que sus  $K_i$  son similares para ambas enzimas (0,8 mM para Cbh1 y 1,3 mM para Cbh4). Ambas enzimas mostraron una inhibición competitiva, comportamiento bastante habitual en la inhibición por celobiosa de las celobiohidrolasas, como la enzima TrCel6A de *T. reesei* (Teleman y col., 1995). La inhibición por celobiosa sufrida por las enzimas Cbh1 y Cbh4 es contrarrestada en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica por la acción de la  $\beta$ -glucosidasa que degrada la

celobiosa presente a glucosa. Es importante que ambas celobiohidrolasas no sean inhibidas por glucosa ya que en el caso de darse ese comportamiento podría ralentizar la hidrólisis, no llegando a los rendimientos esperados. El mecanismo de inhibición de las celobiohidrolasas de *M. thermophila* es desconocido pero existen datos de enzimas homólogas de la familia GH7. Jalak y col. (2012) en un estudio de inhibición con la enzima *TrCel7A* propusieron que la celobiosa competía con las cadenas de celulosa por la unión al sitio activo de la enzima, reduciendo de esta manera el número de puntos de inicio. Además, la celobiosa podría unirse al sitio del producto, lo que restringe la posibilidad del movimiento procesivo, contribuyendo a un mecanismo de inhibición no competitiva. Mientras que la inhibición de las celobiohidrolasas de la familia GH7 ha sido ampliamente estudiada, no existen muchos datos sobre la inhibición de las celobiohidrolasas de la familia GH6, y generalmente la información que hay es usando cócteles más que con enzimas purificadas (Payne y col., 2015).

**Tabla 5.3** Propiedades de distintas celobiohidrolasas: actividad específica con Avicel como sustrato, temperatura y pH óptimo

Organismo	Enzima	Familia	Actividad específica (U/g) (2)	Tª óptima (°C)	pH óptimo	Referencia
<i>M. thermophila</i> C1	Cbh1	GH7	157	50	4,5 - 5,0	Este trabajo
<i>M. thermophila</i> C1	Cbh4	GH6	268	60	5,0 - 6,0	Este trabajo
<i>C. lucknowense</i> (1)	CBHI	GH7	210 (3)	-	5,0 - 5,5	Gusakov y col., 2005
<i>C. lucknowense</i> (1)	CBHIIb	GH6	220 (3)	-	5,0	Gusakov y col., 2007
<i>A. nidulans</i> FGSC A4	CBHII	GH6	-	57	5,5	Bauer y col., 2006
<i>F. pinicola</i>	CBH	GH7	7890	50	5	Shin y col., 2010
<i>H. insolens</i>	CBH I	GH7	-	-	5,0	Schülein y col., 1997
<i>H. insolens</i>	CBH II	GH6	-	-	9,0	Schülein y col., 1997
<i>N. patriciarum</i> J11	CelA	GH6	1100	50	6,0	Wang y col., 2013
<i>P. anserina</i>	<i>PaCel6A</i>	GH6	7,6	55	7,0	Poidevin y col., 2013
<i>P. anserina</i>	<i>PaCel6C</i>	GH6	1,9	35	5,0	Poidevin y col., 2013
<i>P. canescens</i>	<i>PcCel7A</i>	GH7	100 (2)	-	4,0 - 4,5	Volkov y col., 2014
<i>P. occitanis</i>	CBHI	GH7	420	60	4,0 - 5,0	Liman y col., 1995
<i>P. occitanis</i>	CBHII	GH6	130	65	4,0 - 5,0	Liman y col., 1995
<i>P. purpurogenum</i>	CBH	GH7	6500	60	5	Lee y col., 2011
<i>T. aurantiacus</i>	CBHI	GH7	30	65	6	Hong y col., 2003
<i>T. emersonii</i>	CBH IA	GH7	24800	78	3,6	Tuhohy y col., 2002
<i>T. emersonii</i>	CBH IB	GH7	5600	66 - 69	4,1	Tuhohy y col., 2002
<i>T. emersonii</i>	CBHII	GH6	16500	68	3,8	Tuhohy y col., 2002
<i>T. harzianum</i> IOC 3844	ThCBHI	GH7	1250	50	5,0	Colussi y col., 2011
<i>T. reesei</i>	CBHI	GH7	14	-	-	Tomme y col., 1988
<i>T. reesei</i>	<i>TrCel6A</i>	GH6	16,4	65	5,0	Poidevin y col., 2013
<i>T. versicolor</i>	<i>TvCel7a</i>	GH7	138	40	5	Lahjouji y col., 2007

(1) *Chrysosporium lucknowense* está actualmente clasificado como *Myceliophthora thermophila*.

(2) El ensayo de actividad se realizó con 10 g/L de Avicel como sustrato.

(3) El ensayo de actividad se realizó con una concentración de sustrato de 5 g/L de Avicel.



### 5.2.2 Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de las celobiohidrolasas

Cuando se estudiaron las temperaturas óptimas de las enzimas Cbh1 y Cbh4 de *M. thermophila* C1 se determinó que dichas temperaturas era 50° y 60°C respectivamente, ambas con un rango de 5°C por encima y por debajo donde conservan una actividad del 80% (Figura 4.10C y 4.14C). Sabiendo que este organismo es termófilo, concuerda que sus celulasas principales tengan temperaturas óptimas elevadas. En la Tabla 5.3 se muestra la temperatura óptima de algunas de las celobiohidrolasas recogidas en la literatura, y se puede concluir que el óptimo de las celobiohidrolasas aquí caracterizadas se encuentra en el mismo rango que la mayoría de estas, no existiendo diferencias entre familias.

Al analizar la desnaturalización térmica de las enzimas Cbh1 y Cbh4 de *M. thermophila* C1 la temperatura de fusión obtenida fue de 63°C y 66°C respectivamente (Figura 4.10A y 4.14A), similar a los 65°C de la enzima Cel7A de *T. ressei* (Voutilainen y col., 2008), superior a los 60°C encontrados en las CBHI y CBHII de *P. occitanis* (Limam y col., 1995) o los 62°C de la enzima CelA de *N. patriciarum* (Wang y col., 2013) e inferior a la temperatura de fusión de Cel7A de *T. emersonii*, de 75°C (Voutilainen y col., 2014).

Otra característica relevante estudiada fue la termoestabilidad de las enzimas celobiohidrolasas. La importancia del uso de enzimas termoestables recae en que pueden ser usadas directamente tras el pretratamiento, cuando la biomasa aún está a una temperatura elevada. De esta manera se disminuye el tiempo de proceso, con el consiguiente ahorro de energía. Muchas de las celobiohidrolasas descritas en la literatura dicen ser termoestables por resistir temperaturas mayores de 50°C durante escasas horas. En un proceso de hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica las enzimas han de ser activas a 50°C al menos durante las 72 horas que dura el proceso de sacarificación. Previamente, la enzima Cbh1 de *M. thermophila* mostró ser estable hasta 5 y 24 horas de incubación a 50°C (Bukhtjarov y col., 2004, Gusakov y col., 2005), pero en este trabajo se ha demostrado su termoestabilidad durante el proceso completo, haciéndola en este aspecto una candidata ideal para su uso en producción de bioetanol (Figura 4.10B). Otras celobiohidrolasas que muestran ser termoestables durante un tiempo suficiente son la enzima CBHI de *T. aurantiacus* que resiste hasta una semana o la enzima CBH de *Fomitopsis pinicola* que tolera 144h a 50°C (Hong y col., 2003, Shin y col., 2010). Anteriormente se había evaluado la termoestabilidad de la enzima Cbh4 a pH 5,0 y 50°C durante 24h (Gusakov y col., 2007). Sin embargo, en los experimentos realizados en esta tesis se ha demostrado que no es termoestable en esas condiciones, ya que en las primeras 24h de incubación se pierde un 10% de actividad, reduciendo su actividad hasta en un 25% tras las 72h del proceso completo de incubación (Figura 4.14B). Otras celobiohidrolasas de la familia GH6 tampoco resultan termoestables, como es el caso de las enzimas PaCel6A y PaCel6C de *P. anserina* que tan sólo resisten una incubación de 24h a 45° y 35°C respectivamente

(Poidevin y col., 2013) o de la enzima CelA de *N. patriciarum* J11 que tras una hora de incubación tan sólo retiene el 70% de su actividad (Wang y col., 2013).

Aunque la termoestabilidad es una de las características más estudiadas de las enzimas industriales, no existen reglas establecidas que correlacionen la secuencia de aminoácidos de una proteína y esta propiedad. Las variaciones en la estructura secundaria de una proteína termófila frente a una proteína mesófila no son más de las que se encuentran entre dos proteínas homólogas. Esta característica es el resultado de muchos cambios acumulativos en las interacciones hidrofóbicas en el núcleo de la estructura de una proteína, en las interacciones electroestáticas y en los puentes de hidrógeno (Voet 2006). Una explicación a la termoestabilidad es que puede deberse a una superabundancia de puentes salinos en la superficie de la proteína (Voet 2006). También se ha intentado aumentar la termoestabilidad de distintas celulasas de la familia GH6 mediante la introducción de puentes disulfuro adicionales, como es el caso de *Thermobifida fusca* donde semutaron dos residuos de la proteína a cisteína para la formación del puente disulfuro, obteniendo un ligero aumento de la termoestabilidad a la vez que un descenso en la producción de proteína (Ai y Wilson., 2002). Por otro lado, en un estudio con varias celobiohidrolasas de la familia GH6 tanto nativas como modificadas genéticamente, se demostró que mientras los puentes disulfuro son esenciales para mantener la actividad de la enzimas tras una incubación a altas temperaturas, los residuos de cisteína libres contribuyen a la inactivación térmica irreversibles de las proteínas (Wu et al., 2013). Ante estas evidencias y conociendo la pérdida de actividad que sufre la Cbh4 de *M. thermophila* C1 tras la incubación a 50°C durante 72h, podría ser interesante para futuros trabajos mejorar la termoestabilidad de la enzima haciendo especial énfasis en los puentes disulfuro y la presencia de cisteínas libres en su estructura.

Atendiendo al perfil de actividad de las enzimas frente a pH se determinó que el óptimo de la enzima Cbh1 de *M. thermophila* C1 era 4,5-5,0 (Figura 4.10D). Estos datos no concuerdan con los publicados por Gusakov y col. (2005) que afirmaban que el pH óptimo de la enzima se encontraba en el rango de 5,0-5,5. En concreto, a pH 5,5 en este trabajo se observa una caída de la actividad de un 20%. Gusakov y col. (2007) establecieron que el pH óptimo de la Cbh4 (nombrada como CBHIIb) era de 5,0, sin embargo se ha demostrado que la enzima tiene un rango óptimo ampliado, manteniendo el 100% de su actividad entre pH 5,0 y 6,0 (Figura 4.14D). El rango de pH óptimo de ambas celobiohidrolasas es adecuado para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica en las condiciones del proyecto para la producción de bioetanol de segunda generación. La mayoría de las celobiohidrolasas fúngicas caracterizadas tienen un pH óptimo desplazado a zonas ácidas como se observa en la Tabla 5.3, sin observarse diferencias entre las familias GH6 y GH7 más allá de las propias entre diferentes enzimas de una misma familia.



### 5.3 La enzima Eg2 frente a otras endoglucanasas

La actividad catalítica de las enzimas endoglucanasas (EC 3.2.1.4) es la hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\beta(1,4)$  internos de los polímeros de celulosa, de manera aleatoria. Pueden pertenecer a diversas familias de glicosil hidrolasas, como GH 5, 6, 7, 9, 12 y 45. Dependiendo de la familia a la que pertenecen contienen una mayor especificidad por unos sustratos u otros (Vlasenko y col., 2010). La enzima Eg2 de *M. thermophila* C1 pertenece a la familia GH5. La secuencia consta de 389 aminoácidos subdivididos en un péptido señal (residuos 1-16), un dominio de unión a carbohidratos tipo I (residuos 17-52), un conector rico en serina y treonina (residuos 53-86) y un dominio catalítico de la familia GH5 (residuos 87-389), dominios según InterProScan (Jones y col., 2014).

Los residuos catalíticos han sido identificados por homología con otras endoglucanasas de la familia GH5, en concreto con la enzima Cel5A de *T. aurantiacus* (Leggio y col., 2002). Glu216 es el residuo ácido/base mientras que Glu323 es el nucleofílico, mostrados en la Figura 5.4 resaltados en rosa. Además esta enzima conserva otros residuos del sitio activo propios de esta familia: Arg132, His176, Asn215, His281, Tyr283 y Trp356. El sitio activo está formado por un surco surcado por aminoácidos aromáticos típica de las glicosil hidrolasas: Trp356, Trp361, Trp362, Trp253, Trp257 y Tyr200. Estos aminoácidos se encuentran conservados a excepción de Trp278, Trp279 y Trp174 en la endoglucanasa de *T. reesei*. La conformación *cis* del enlace peptídico que une los residuos Trp356 y Ala357 está conservada en la familia 5 y se cree que es importante para el posicionamiento de la cadena lateral del triptófano, lo cual es importante para la unión al sustrato. Al igual que el residuo Trp356, se ha descrito que el residuo conservado His176 participa en la unión al sustrato (Leggio y col., 2002).

La enzima Eg2 cuenta con 3 posibles sitios de N-glicosilación, Asn93, Asn156 y Asn260. Gusakov y col. (2008) demostraron que tan sólo el residuo Asn156 estaba ocupado. Sin embargo, se encuentra ampliamente descrita la dependencia del tipo y las condiciones de cultivo del hongo (Stals y col., 2004), por lo que en las condiciones de fermentación utilizadas en este trabajo no se puede afirmar que no haya más sitios ocupados con diferentes cadenas de azúcares, explicando de esa manera al aumento de peso experimental respecto al teórico de 8 kDa (Tabla 4.11). También cuenta con dos sitios de O-glicosilación en el dominio catalítico, Thr261 y Ser297, predichos por el programa NetOGlyc 4.0 Server (Julenius y col., 2005), además de múltiples sitios en el péptido de unión.

Presenta una identidad del 74% con la endoglucanasa 3 de *N. crassa*, un 61% con la Eg3 de *F. oxysporum* y un 66% con la endoglucanasa de *A. fumigatus* (números de acceso en pie Figura 5.4).

M\_thermophila -----mkssilasvfatgavaQSGPQQCGGIGWGQSTDCVSGYCHVCYQNDWYSQCVPGA 55  
F\_oxysporum -----mkslfalslfaaglsvaQNAAWAQCGGNGWGTGSKNCVSGYCTTVVNEWYSQCIPGT 55  
N\_crassa -----mkatilastfaagalaQSGAWGQCGGNGWSGATSCISGYACNYVNDWYSQCIPGT 55  
T\_ressei mnksvaplllaasilyggavaQQTVWVGQCGGIGWSGPTNCPAGSACSTLNPYYAQCTPGGA 60  
A\_fumigatus -----  
T\_aurantiacus -----

M\_thermophila ASTTLQTSTTSRPATATSTAPPS-STTSPSKGKGLKWLGSNESGAEEFGEGNYPGLWGKHFI 114  
F\_oxysporum AEEPPTTL-----KTTTGGGSTPTGTGNGKFLWVGTNEAGGEFGEGSLPGTWGKHFI 109  
N\_crassa AAPPTTAAATTLVTSTKTAPASTTTATASGKFKWFVNENAGGEFGDGIFFPGRWTEFT 115  
T\_ressei TTITTTSTRPPSGPTTTTTRATSTSSSTPPTSSGVRFAGVNIAGFDGCTTDTGT-CVTSKVY 119  
A\_fumigatus ----mk--fgsivliaaaagfavaAPAKRASVFWFVGSNESGAEEFGENTIPGSYGKEFI 54  
T\_aurantiacus -----AKVFWFVGSNESGAEEFGSQNLPGVEGKDIYI 31  
. \* \* \* : \* : \* :

M\_thermophila -----PST--SAIQTLINDGYNIFRIDFSMERLVPNQLTSSFDEGYLRNLTEV 160  
F\_oxysporum -----PDP--AAVDTLISQGYNAFRVQLRMERTNPSSMTGPFDTAYLKNLTIT 155  
N\_crassa -----PDT--NTIQTLRSQGYNIFRVGFAMERLVPNTLTSSFDNGYLTNLNQV 161  
T\_ressei PPLKNFTGSNNYPDGIQMQHFVNEDGMTIFRLPVGWQYLVNNNLGGNLDSTSSISKYDQL 179  
A\_fumigatus -----PDP--STISTLIGKGMNIFRIQFLMERLVPNSMTGSYNEEYLANLTSV 100  
T\_aurantiacus -----PDP--NTIDTLISKGMNIFRVPFMMERLVPNSMTGSDPNYLAADLIAT 77  
\* . : \* . \* : . : . : . :

M\_thermophila VNFVTNAGKYAVLDPHNYGRYGNVITD---TNAFRTFTWNLAKQFASNSLVIFDTNNE 216  
F\_oxysporum VDHTITGKGANVILDPHNYGRYFDKIITS---TSDFTQWWKNFATQFKNSKVIPTDNNE 211  
N\_crassa VNSVTNSGAYIVLDPHNYGRYVGKIITS---TDAFKTFWQNVAAKFASNSKVIPTDNNE 217  
T\_ressei VQGCLSLGAYCIVDHNHYARWNGGIIGQGPTNAQFTSLWSQLASKYASQSRVWFVGINNE 239  
A\_fumigatus VDAVTGAGSYAILDPHNFGRYNGQIISS---TDDFKTFWQNLAKGFKSNLVLVIFDTNNE 156  
T\_aurantiacus VNAITQKGAYAVVDPHNYGRYNSIIS---PSDFQTFWKTVASQFASNPVLVIFDTNNE 133  
\* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* :

M\_thermophila YNTMDQTLVLNQLAAIDGIRAAGATSQYIFVEGNAWSGANWSWNTT--NTNMAALTDP-- 272  
F\_oxysporum YNTMDQTLVLNQLAAINGIRAAGAT-QTIFVEGNQWSGANSWPDV--NDNMKALTDP-- 266  
N\_crassa YNTMDQTLVLNQLAAIDGIRAAGATSQYIFVEGNQWTGANSWNTV--NTNLAALTDP-- 273  
T\_ressei PHDVNINTWAATVQEVVTAIRNAGATSQFISLPGNDWQSAGAFISDGSAAALSQVTNPDG 299  
A\_fumigatus YHDMQTLVLNQLAAINGIRAAGATSQYIFVEGNSWTGAWTWADV--NDNLKALTDP-- 212  
T\_aurantiacus YHDMQTLVLNQLAAIDGIRSAGATSQYIFVEGNSWTGAWTWNTV--NDNMKSLTDP-- 189  
. : : . \* : . \* \* \* \* \* : \* \* \* . \* : : : : \* :

M\_thermophila -QNKIVYEMHQYLDSDSSSGTHAECVSSNIGAQRVVGATQWLNRANKGLGVLGEFAGGANAV 331  
F\_oxysporum -LDKIVYEMHQYLDSDSSSGTSPNCVSTTIGVERVKAATEWLNRANKKIGMIGELAGGPNDT 325  
N\_crassa -ENKIVYEMHQYLDSDSSSGTSTACVSSEIGVQRIVGATAWLNRANKKKGLGVLGEFAGGANSV 332  
T\_ressei STTNLIFDVHKLQYLDSDNSGTHAECTTNNIDGA-FSPLATWLRQNNRQAILTETGGGNVQS 358  
A\_fumigatus -QDKIVYEMHQYLDSDSGSGTAESCSTTIGKERVSAATKWLKDNKKGVIIGEFAGGVNDQ 271  
T\_aurantiacus -SDKIIVYEMHQYLDSDSGSGTSATCVSSTIGQERITSATQWLNRANKKGKGIIGEFAGGANDV 248  
: : : : \* : \* \* \* \* \* \* : : . : \* : \* : : : \* :

M\_thermophila CQQA VTGLLDHQLQDNSEVWL GALWVAAGPWWGDYMYSFEPSPSGTGYVNYNSILKKYLP-- 389  
F\_oxysporum CKTAVKNMLDYLKENS DVWKGVTWVAAGPWWADYMFSEFPSSGTGYQYNSLLKTYI--- 382  
N\_crassa CKAAVTGLLEHLKANTDVWEGALWVAAGPWWGDYMYSFEPSPSGTGYQYNSLLKTYI--- 390  
T\_ressei CIQDMCQIQIYQLNQNSDVYLG YVGGAGSFDSTYVLTETPTSSGNSWTDTSLSVSSCLARK 418  
A\_fumigatus CRTAISGMLEYLAQNTDVWKGALWVAAGPWWGNVYMFNMEPPSGAAYVGMLDILEPYLG-- 329  
T\_aurantiacus CETAITGMLDYMAQNTDVWGTGAIWVAAGPWWGDYIFSMEDPNGIAYQQILPILTPYLP--- 305  
\* : : : : \* : \* \* \* \* \* \* : : \* : : : : :

**Figura 5.4** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la enzima Eg2 de *M. thermophila* C1 con endoglucanasas de la familia GH5 realizado con el programa ClustalOmega (Sievers y col., 2011). Las secuencias en minúsculas resaltadas en gris son los péptidos señal de las proteínas predichos por el programa SignalP 4.1 (Petersen y col., 2011). Resaltado en azul se representa en dominio de unión a carbohidratos tipo I. Las secuencias de aminoácidos en verde representan el conector. Los residuos conservados en la familia GH5 se marcan en amarillo, mientras que los residuos catalíticos están resaltados en rosa y aquellos que forman el sitio activo en verde. En la secuencia de Eg2 de *M. thermophila* los residuos de asparragina suceptibles de N-glicosilación se encuentran marcados en negrita al igual que los de serina y treonina suceptibles de O-glicosilación. En rojo se marca un residuo con posible implicación en el perfil de pH (Wang y col., 2005). Números de acceso: *N. crassa* XP\_964159.1; *F. oxysporum* EMT69524.1; *A. fumigatus* Z5 KMK63077.1; *T. reesei* P07982.1; *T. aurantiacus* AAL88714.2.

### 5.3.1 Caracterización de la enzima Eg2

En el proceso de obtención de bioetanol de segunda generación, la hidrólisis de biomasa lignocelulósica se lleva a cabo a un elevado porcentaje de sólidos totales (20%) por lo que la viscosidad del hidrolizado dificulta la mezcla del mismo y por tanto la accesibilidad de las enzimas a su sustrato. En las primeras horas de hidrólisis se observa una drástica reducción de la viscosidad, probablemente debido a la disminución gradual de la longitud de los polímeros de la celulosa, llevada a cabo por la acción de las endoglucanasas, las cuales son las primeras en actuar realizando cortes hidrolíticos en las zonas internas de la celulosa. Debido a este motivo cobran una especial importancia para la industria, encontrándose un gran número de endoglucanasas caracterizadas en la literatura. Sin embargo, no existen buenos sustratos modelo para realizar una caracterización cinética. Cuando se trató de llevar a cabo la caracterización cinética de la enzima Eg2 la curva de dilución (actividad frente a concentración de enzima) no fue lineal. Algunos autores reflejan constantes cinéticas con CMC, pero objetando este mismo problema (Macarrón y col., 1993). Vlasenko y col., 2010 caracterizaron previamente una endoglucanasa de *M. thermophila* de la familia GH5, Cel5A, en un estudio comparativo entre la actividad específica de distintas familias de endoglucanasas frente a distintos sustratos poliméricos. Los resultados de este estudio no son comparables debido a las diferencias en las condiciones de ensayo.

De las endoglucanasas caracterizadas de la familia GH5 (Tabla 5.4), la enzima Eg2 es de la más activas a excepción de la EG de *P. purpurogenum* KJS506 y la EG de *F. pinicola* que es casi un orden de magnitud más activa que ésta. Casi todas las endoglucanasas aquí revisadas son menos activas frente a CMC. Como se explicó previamente en la introducción, las endoglucanasas carecen de actividad o son poco activas frente celulosa cristalina, llevando a cabo su actividad en las zonas amorfas de los polímeros. Como se observa en la Tabla 5.4, las endoglucanasas caracterizadas presentan una actividad específica muy baja o en algunos caso no detectable frente a sustratos de celulosa cristalina como el Avicel.

Como se detalló en los resultados (apartado 4.4.2), la enzima Eg2 no se inhibe por glucosa, habiendo alcanzado concentraciones en ensayo de hasta 0,5 M. En el caso de la celobiosa, la enzima sufre una inhibición del 30% a una concentración de celobiosa de 80 mM. Se conoce de manera experimental que durante el proceso de hidrólisis de rastrojo de maíz pretratado utilizado en este proyecto, las máximas concentraciones de celobiosa alcanzadas durante el proceso serán de 6 g/L (16 mM) en las primera 24h, debido a la acción simultánea de la enzima Bgl1, que hidroliza la celobiosa a glucosa. A dichas concentraciones de inhibidor, según los resultados obtenido en el ensayo de inhibición, la enzima mantiene una actividad del 80% en el ensayo con sustrato análogo. Afirmar que este comportamiento se pueda extrapolar durante la hidrólisis de biomasa no podría considerarse correcto, pues ni la concentración, ni el tipo de sustrato son similares. Como se ha descrito previamente, la inhibición de las enzimas depende en gran medida de la naturaleza del sustrato,

variando la constante de inhibición hasta en dos órdenes de magnitud cuando se utilizan sustratos celulósicos o sustratos análogos oliméricos (Gruno y col., 2004). Sin embargo, con los datos obtenidos se podría asumir que la inhibición de la enzima Eg2 por celobiosa durante el proceso de hidrólisis de PCS será prácticamente despreciable.

**Tabla 5.4** Propiedades de distintas endoglucanasas

Organismo	Enzima	Familia	Actividad específica (U/mg)		T <sup>a</sup> óptima (°C)	pH óptimo	Referencia
			CMC	Avicel			
<i>M. thermophila</i> C1	Eg2	GH5	74,0	0,10	50 - 65	5,5	Este trabajo
<i>M. thermophila</i>	MtEg7	GH7	106,0	0,24	60	5,0	Karnaouri y col., 2014
<i>P. verruculosum</i>	PvEGIII	GH12	24,0	-	-	4,0	Tishkov y col., 2013
<i>Melanocarpus</i> sp. MTCC 3922	EGI	GH5	25,0	3,00	50	6,0	Kaur y col., 2007
<i>Melanocarpus</i> sp. MTCC 3922	EGII	GH5	35,0	ND	70	5,0	Kaur y col., 2007
<i>N. crassa</i>	GH5-1	GH5	25,0	-	-	-	Sun y col., 2011
<i>A. fumigatus</i> Z5	Egl2	GH5	1,8	<0,01	50	5,0	Liu y col., 2011
<i>A. fumigatus</i> Z5	Egl3	GH5	2,4	0,15	60	4,0	Liu y col., 2011
<i>A. aculeatus</i>	EG	-	14,0	<0,01	40	5,0	Naika y col., 2007
<i>T. aurantiacus</i>	EG	GH5	18,0	-	70 - 80	4,0 - 4,4	Parry y col., 2002
<i>P. purpurogenum</i> KJS506	EG	GH5	110,0	70,00	70	5,0	Lee y col., 2010
<i>F. oxysporum</i>	EG	-	22,5	ND	50	6,0	Christakopoulos y col., 1990
<i>P. xylanilyticus</i> KJ-03	Cel5A	GH5	0,2	0,13	40	6,0	Park y col., 2012
<i>P. occitanis</i> Pol 6	EG A	GH12	4,7	0,02	60	3,5	Chaabouni y col., 2005
<i>P. occitanis</i> Pol 6	EG B	GH12	3,3	0,03	50	3,5	Chaabouni y col., 2005
<i>F. pinicola</i>	EG	GH5	944,0	226,00	60	5,0	Yoon y col., 2008

ND: Actividad no detectada.

### 5.3.2 Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de Eg2

La actividad celulasa de un cóctel no industrial de *M. thermophila* medida con papel de filtro muestra su máximo a 65°C, lo que supone 2,3 veces más actividad que a 50°C (Matsakas y col., 2015). Aunque este ensayo muestra la capacidad celolítica del cóctel enzimático y no puede ser individualizado para cada una de las enzimas, demuestra que algunas de las enzimas presentes en ese cóctel responsables de la degradación de la celulosa tienen un máximo de actividad en torno a los 65°C. Se podría concluir que no se conoce qué enzimas se encuentran expresadas en dicha cepa, sin embargo podría ser que una de las enzimas contribuyente a este fenómeno sea la enzima Eg2, cuya temperatura óptima se encuentra definida en un rango de 50 a 65°C (Figura 4.18C). El ensayo no fue llevado a cabo a temperaturas superiores debido a que, en este proyecto, el proceso de hidrólisis industrial de biomasa no se encuentra optimizado por encima de los 65°C, por lo que no se consideró aumentar esta temperatura en los ensayos enzimáticos. Teniendo en cuenta que *M. thermophila* es un organismo termófilo estos datos resultan razonables. En el caso de los hongos termófilos como *T. aurantiacus* observamos que la temperatura óptima de la endoglucanasa GH5 se encuentra entre los 70 y los 80°C, mientras que el óptimo de las enzimas Cel5A de la bacteria aerobia *Paenibacillus xylanilyticus* KJ-03 o la endoglucanasa del hongo *Aspergillus aculeatus* aparece a los 40°C. En la Tabla 5.3 se

encuentra detalladas algunas de las temperaturas óptimas de endoglucanasas descritas en la literatura.

En un estudio con distintas endoglucanasas de la familia GH5 se demostró que tanto la temperatura óptima de las enzimas como la termoestabilidad de las mismas no estaban relacionadas con ningún aminoácido en concreto pero sí con la flexibilidad de la estructura de la proteína (Badieyan y col., 2012). Del mismo modo Liang y col., (2011) confirmaron que realizando mutagénesis dirigida en la endoglucanasa de la familia de GH5 de la bacteria *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 se obtenían mutantes con distintos perfiles de temperatura, aumentando los niveles de actividad a temperaturas por debajo de los 75°C, óptimo de esta proteína. Dichos mutantes presentaban menos puentes de hidrógeno en su estructura haciéndola mas flexible.

Cuando se estudió la desnaturalización térmica de la enzima Eg2 se obtuvo una  $T_m$  de 54°C. Este valor se encuentra por debajo de otras  $T_m$  de endoglucanasas descritas en la literatura como los 57°C de la endoglucanasa de *A. aculeatus* (Naika y col., 2007), los 69°C de Hj\_Cel5A de *Hypocrea jecorina*, la forma sexual de *T. Reesei* (Lee y col., 2011), o los 81°C del la endoglucanasa del hongo termófilo *T. aurantiacus* (Parry y col., 2002). A pesar de la baja  $T_m$  que presenta la enzima Eg2 de *M. thermophila* C1, esta enzima es termoestable a las condiciones de proceso de hidrólisis a pH 5 y 50°C durante 72 horas (Figura 4.18B), mientras que otras enzimas endoglucanasas de *M. thermophila* no resisten la incubación a 50°C, como es el caso de MtEg7 de la familia GH7 que tras 24h de incubación tan sólo conserva un 60% de la actividad inicial (Karnaouri y col., 2014a).

El comportamiento de la enzima Eg2 respecto a la temperatura la hace una proteína idónea para el propósito de su uso en la obtención de bioetanol de segunda generación, por ser estable a las condiciones de proceso y tener un amplio rango de temperatura óptima. Con estas características resulta una proteína versátil que, ante un posible aumento de la temperatura de hidrólisis, podría ser igualmente utilizada. En tal caso se habría de determinar la termoestabilidad a la temperatura deseada.

La enzima Eg2 tiene un pH óptimo de 5,5 manteniendo la actividad por encima del 80% entre pH 4,5 y 6,0 (Figura 4.18D). Como se observa en la Tabla 5.4 el pH óptimo de esta enzima se encuentra dentro de los valores usualmente encontrados en la bibliografía para endoglucanasas fúngicas. Dependiendo de la aplicación que se vaya a dar a las enzimas endoglucanasas será conveniente que el pH óptimo de la enzima se encuentre desplazado hacia zonas básicas o ácidas. En el caso de la hidrólisis de lignocelulosa, el uso de enzimas cuyo pH óptimo sea ácido favorece el uso de menores cantidades de bases para corregir el pH ácido del pretratamiento y supone una ventaja en el proceso global, pues se podrían combinar las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática.

Wang y col., (2005) demostraron la importancia del residuo Asn321 de la enzima EgIII de *T. ressei*, homóloga a la enzima Eg2 de *M. thermophila*, para el perfil de pH de ésta. Mutando este aminoácido por distintos residuos observaron cambios en el pH

óptimo de la proteína sin reducción de su actividad. Este residuo se encuentra conservado en la familia GH5, correspondiendo al residuo Asn315 de la enzima Eg2 de *M. thermophila* (marcado en rojo en la Figura 5.3), por lo que si en futuros trabajos se decidiera variar el pH óptimo de esta enzima, una buena aproximación sería intentar mutar dicho residuo en búsqueda de perfiles más beneficiosos para el proceso.

#### 5.4 Búsqueda de las enzimas para la composición del cóctel mínimo

La plataforma de expresión de *M. thermophila* C1 fue desarrollada inicialmente por Dyadic International Inc. para la expresión de proteínas celulolíticas con aplicación en la industria textil y papelería (Visser y col., 2011). Sin embargo, dadas las capacidades de secreción del organismo y las ventajas que ofrece para la producción industrial, posteriormente se aplicó a otros productos o procesos, como en la producción de bioetanol de segunda generación. Centrados en esta última aplicación, en esta tesis se ha demostrado la calidad individual de las enzimas secretadas por *M. thermophila* C1 mediante ensayos enzimáticos con sustratos naturales o análogos. Pero teniendo en cuenta que el objetivo final de estas enzimas es su uso en la producción de bioetanol de segunda generación, es necesario conocer cómo actúan en conjunto en la hidrólisis de un material lignocelulósico, en concreto de PCS. Para ello se hizo uso de mezclas artificiales de enzimas purificadas, una potente herramienta que arroja luz sobre la funcionalidad de cada una de las enzimas empleadas. Muchos son los investigadores que han descrito el uso de estas mezclas para validar o tratar de mejorar cócteles enzimáticos de otros hongos celulolíticos como *T. reesei* o *A. niger* (Gao y col., 2010, Fang y col., 2010). Mediante el uso de estas mezclas artificiales se abordó la generación un cóctel mínimo con las enzimas de *M. thermophila* C1. El concepto de cóctel mínimo hace referencia a la identificación del mínimo número de enzimas, a la dosis mínima y en la combinación óptima para degradar un sustrato determinado. Este concepto se respalda en una hipótesis: que las mezclas multicomponentes secretadas por el hongo sin modificar no son óptimas para la degradación de materiales lignocelulósicos pretratados y que es posible remplazar los cócteles enzimáticos crudos con combinaciones diseñadas con el número mínimo de enzimas necesarias para el procesamiento de biomasa (Meyer y col., 2009).

Las principales actividades celulolíticas que componen el secretoma de *M. thermophila* C1 son las que vienen dadas por las enzimas caracterizadas en esta tesis: Eg2, Cbh1, Cbh4 y Bgl1. Estas enzimas representan el 60% del total de proteína secretada, según la cuantificación llevada a cabo en este grupo, por lo que se eligieron estas cuatro enzimas para componer el cóctel mínimo CM 4. Previamente, valiéndose del uso de mezclas artificiales se evidenció la calidad de las celulasas Cbh1 (CBH Ia), Cbh4 (CBH IIb) y Eg2 (EG II), mostrando un rendimiento extremadamente alto en la conversión de diferentes sustratos celulósicos (Avicel, algodón, madera de abeto pretratada) en glucosa (Gusakov y col., 2007). En dicho trabajo las hidrólisis fueron



llevadas a cabo a un máximo de 5% sólidos totales, debido a que las enzimas ofrecen un menor rendimiento en hidrólisis al aumentar los sólidos totales (Le Costaouëc y col., 2013). Por ello, debido a que al incrementar la concentración de biomasa, así como por el hecho de estar la biomasa pretratada, las actividades enzimáticas requeridas pueden variar, se creyó necesario adaptar el uso de la mezclas sintéticas de estas enzimas a las condiciones marcadas por el proceso industrial de producción de bioetanol de 2G de este proyecto. Para ello, en primer lugar se llevó a cabo una hidrólisis de PCS con las cuatro celulasas principales del cóctel de *M. thermophila* C1 a las proporciones en las que se encuentran en el cóctel secretado por el hongo (CM 4). Esta combinación permitió alcanzar un 62% del rendimiento de glucosa del cóctel nativo producido por la cepa industrial de *M. thermophila* C1 (Figura 4.19). En su trabajo, Gusakov y col., (2007) afirmaban encontrar una combinación con las enzimas Cbh1, Cbh4 y Eg2 que, con la adición de una BGL exógena de *Aspergillus japonicus* para eliminar el fenómeno de la inhibición por glucosa, superaba con creces el rendimiento del cóctel natural. En el caso de este trabajo, debido a que el control utilizado en este experimento fue una cepa industrial que ha sufrido diversas modificaciones para la mejora de la hidrólisis de lignocelulosa, se dedujo que se necesitaban otras actividades para alcanzar el rendimiento del cóctel nativo.

Tradicionalmente se asumía que la degradación de la celulosa se producía por la acción sinérgica de las distintas familias de celulasas hidrolíticas; sin embargo, recientemente se han identificado una serie de enzimas accesorias que estimulan la hidrólisis de la pared celular de las plantas. Entre ellas destacan las enzimas polisacárido monooxigenasas (PMO), enzimas oxidativas dependientes de cobre, pertenecientes a la familia AA9 y que actúan directamente sobre la celulosa produciendo cortes oxidativos. Las PMO se clasifican en tres tipos en función del átomo de carbono que oxidan: el tipo 1 genera productos oxidados en el C1, el tipo 2 que genera productos oxidados en el C4 y el tipo 3 que oxida tanto C1 como C4 con menor especificidad que los otros dos tipos (Bey y col., 2013). Existe dentro de la familia 3 un subconjunto de enzima fúngicas, llamado PMO3\*, que parece haber perdido su actividad en C4 y tan sólo lleva a cabo su acción en C1. *M. thermophila* C1 tiene en su genoma hasta 26 PMO (Karnaouri y col., 2014), de las que las más abundantemente expresadas son: PMO-01470 y la PMO-06230 de tipo 1, PMO-09768 de tipo 3 y PMO-04725 de tipo 3\*, por lo que se purificaron para estudiar su efecto en experimentos de suplementación del cóctel mínimo.

Karnaouri y col., (2016) observaron que la suplementación con una enzima MtGH61 que corresponde a una PMO tipo 3, sobre un cóctel mínimo de celulasas de *M. thermophila* tenía un efecto potenciador de entre el 5-6% de incremento en la hidrólisis de materiales lignocelulósicos pretratados como la paja de trigo, la madera de pino o abedul. Cuando suplementamos con las distintas enzimas PMO antes mencionadas se obtuvieron incrementos de entre 35-60% en la liberación de glucosa, evidenciando un mayor rendimiento de estas enzimas (Figura 4.20A). Se concluye que la contribución de la enzima PMO-01470 de tipo 1 es la que aporta un mayor rendimiento en la conversión de glucosa en la hidrólisis de PCS, seguida de la enzima PMO-09768 de tipo 3. Este efecto se evidencia también en la producción de productos oxidados, en concreto de ácido glucónico (Figura 4.20B). Frommhagen y col. (2016)

purificaron tanto la enzima PMO-09768 como la PMO-06230, denominadas *MtLPMO9A* y *MtLPMO9B* respectivamente. Demostraron que la incubación de ambas enzimas con celulosa amorfa regenerada resultaba en 3 veces mayor cantidad total de productos oxidados con la PMO-06230 que con la PMO-09768. Sin embargo, este efecto no se extrapola a la hidrólisis de PCS, donde se observa como la enzima PMO-09768 permite mayor liberación de glucosa, y un ligero incremento de la liberación de ácido glucónico respecto a la PMO-06230. Este hecho demuestra la importancia de testar las enzimas en las condiciones más cercanas al proceso permitidas, ya que el comportamientos de las enzimas con distintos sustratos varían en gran medida. Por otro lado, en trabajos anteriores, la enzima PMO-09768 demostró la capacidad de realizar cortes oxidativos tanto en el xilano como en la celulosa (Frommhagen y col., 2015). Esta capacidad podría ser la responsable de la mayor eficacia en la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica pues liberaría las cadenas de celulosa haciéndolas más accesibles al resto de celulasas.

Se ha descrito que las enzimas PMO necesitan poder reductor para llevar a cabo los cortes oxidativos cuando actúan sobre celulosa pura. Por otro lado, se ha demostrado que elementos no celulósicos presentes en los sustratos lignocelulósicos pretratados, como la lignina o la hemicelulosa, son capaces de actuar como agente reductor en la actividad monooxigenasa de manera que no es necesaria la adición de agentes reductores adicionales como el ascorbato (Dimarogona y col., 2012; Johansen K.S., 2016)

Debido a que las enzimas PMO más representadas en el cóctel secretado por *M. thermophila* C1 era las enzimas PMO-06230 y PMO-04725, suponiendo en torno a un 10% de la proteína total cada una de ellas, se estudió su suplementación sobre CM 4 por separado y de manera combinada (CM 6). En la Figura 4.21A se observa que existe un efecto sinérgico entre la actividad de ambas PMO, alcanzado un factor de sinergia de 1,1. Este factor de sinergia también se observa en la producción de ácido glucónico donde la suma de la liberación de este producto por ambas enzimas de manera individual es menor que cuando actúan de manera conjunta con una factor de sinergia de 1,26. Se ha descrito ampliamente el efecto sinérgico de las enzimas PMO con diferentes celulasas y con enzimas con actividad celobiosa deshidrogenasa (Dimarogona y col., 2012, Bey y col., 2013) sin embargo hasta ahora no se había demostrado el efecto sinérgico entre PMO. El mecanismo de sinergismo es desconocido.

En este caso, con la suplementación conjunta de ambas PMO se alcanzó un 100% de la liberación de glucosa conseguida con el cóctel industrial de *M. thermophila* C1. Sin embargo creemos que un reajuste de las proporciones de las enzimas puede dar lugar a mejores rendimientos, lo que se analizó posteriormente.



#### 5.4.1 Influencia individual de cada una de las celulasas en el cóctel mínimo CM 6

La eliminación individual de cada una de las enzimas que componen el cóctel mínimo compuesto por Eg2, Cbh1, Cbh4, Bgl1, PMO-06230 y PMO-04725 (CM 6) muestra la contribución que cada una de ellas aporta en la hidrólisis del PCS. Este experimento se abordó desde dos ópticas diferentes: eliminando cada una de las enzimas de manera individual del cóctel sintético y por consiguiente disminuyendo la dosis total de enzima, y por otro lado se eliminaron las celulasas, pero compensado la dosis total con el resto de las enzimas presentes manteniendo la proporción entre ellas. Atendiendo a la primera parte del experimento donde se disminuía la dosis total de enzima, las celulasas que mayor impacto tienen en la hidrólisis son las enzimas Cbh1, PMO-06230 y Bgl1, por orden de reducción del rendimiento (Figura 4.22).

El rendimiento obtenido ante la falta de Bgl1 se encuentra representado de manera muy aproximada por la suma de la glucosa y la celobiosa. La acumulación de la celobiosa presente en la hidrólisis debido a la ausencia de actividad celobiasa, inhibe la actividad de, al menos, las enzimas celobiohidrolasas y endoglucanasas, como se ha visto anteriormente en la caracterización de las enzimas (Apartados 4.2.2, 4.3.2 y 4.4.2). Esta inhibición merma el rendimiento de tal manera que incluso cuando se compensa la falta de la enzima Bgl1 aumentando el resto de celulasas se observa que el rendimiento se mantiene invariable, evidenciando la importancia de esta enzima en la hidrólisis de la celulosa y hasta qué punto puede suponer un cuello de botella.

La enzima Cbh1 ha demostrado no ser una enzima especialmente activa tanto frente a sustratos solubles como a sustratos celulósicos en comparación con otras enzimas de su familia (Apartado 5.2.1), sin embargo, su alta representación en el cóctel hace que su ausencia suponga una caída del rendimiento de un 32%. En el CM 6, la enzima Cbh1 tiene una dosis de 3,99 mg/g de glucano de un total de 10,64 mg/g de glucano lo que supone un 37,5% del total de proteína. La disminución de tal proporción de dosis afecta en gran manera al rendimiento. Sin embargo, cuando tal dosis se reemplaza aumentando el resto de celulasas el rendimiento en glucosa alcanza el 85% del valor obtenido con CM 6. Este resultado indica que parte de la acción de esta enzima puede ser realizada por el resto de celulasas, probablemente las enzimas Eg2, Cbh4 y PMO suplan parte de su acción. No obstante, el 15% de rendimiento restante es exclusivo de la acción de la enzima Cbh1, siendo ésta una de las enzimas de mayor contribución al cóctel.

Atendiendo a la merma de rendimiento en hidrólisis cuando se elimina uno de los componentes, la PMO-06230 es la siguiente en importancia tras la enzima Cbh1, alcanzando tan solo un 74% del valor con CM 6 tras su eliminación. Si bien, la Cbh1 representaba un gran porcentaje de la dosis total, la representación de la PMO-06230 no supera el 10%, por lo que normalizando la bajada de rendimiento a la dosis de cada una de las enzimas, esta PMO sería la que mayor impacto tendría para la hidrólisis de esta biomasa lignocelulósica. Esta afirmación se respalda cuando la dosis

se restablece con las otras celulasas, donde se aumenta tan sólo en 5 punto porcentuales. Esto demuestra que la actividad de la PMO-06230 es irremplazable, a pesar de contar en el CM 6 con otra enzima con actividad PMO.

Szijarto y col. (2011) identificaron la enzima endoglucanasa Cel5A de *T. reesei* como una de las enzimas claves para una rápida licuefacción de paja de maíz pretratada y por consiguiente la reducción de la viscosidad a altos sólidos totales. Del mismo modo en *M. thermophila* también se han identificado endoglucanasas responsables de esta acción, en concreto una GH7 (Karnaouri y col., 2014a). No obstante, en esta tesis se ha demostrado que la presencia de la enzima Eg2 en el CM 6 no es tan relevante como otras de las celulasas a tiempo final de 72h, aunque no se descarta su efecto a tiempos cortos. Esta enzima, a pesar de tener una alta actividad frente a CMC respecto a otras enzimas caracterizadas, no tiene un alto impacto en la hidrólisis de PCS, pudiendo parcialmente remplazar su actividad por parte del resto de las celulasas. Probablemente, la actividad sinérgica de las enzimas PMO sean las que sustituyan el ataque inicial de las regiones amorfas de la celulosa con cortes oxidativos.

Tanto las enzimas Cbh4 como la PMO-04725 parecen ser las que menor contribución tienen en la hidrólisis de esta biomasa lignocelulósica. Al eliminarlas del cóctel sintético CM6 el rendimiento baja un 10% para la enzima Cbh4 y un 13% en el caso de la PMO-04725. Al remplazar sus dosis con las otras celulasas se alcanzan rendimientos del 95% y 91% respectivamente. Aunque la acción de estas enzimas es importante en la sinergia con otras celulasas, según los datos obtenidos son las que tienen una menor relevancia en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica del CM 6.

#### 5.4.2 Optimización de las proporciones de las distintas celulasas del cóctel mínimo (CM 6) para la hidrólisis de PCS

*M. thermophila* fue aislada de suelos donde la materia orgánica celulósica disponible se compone principalmente de restos de hojas y ramas. Este hongo ha sufrido una serie de mutaciones a lo largo de su desarrollo como plataforma de expresión para convertirse en una cepa superproductora. Para la obtención de la cepa industrial productora de celulasas, las principales modificaciones han sido la sobreexpresión y delección de algunas enzimas, y ya que el nivel de sobreexpresión que se logra para cada enzima no es muy predecible, sería esperable que las proporciones conseguidas no sean las óptimas para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica pretratada y puedan existir unas proporciones más eficientes para tal fin.

Mediante un experimento de diseño estadístico de mezclas con las celulasas principales de *T. reesei*, Rosgaard y col. (2007) demostraron que existía una proporción de enzimas diferente a la secretada por el hongo que suponía una mayor eficiencia en la degradación de la paja de cebada. Aunque las condiciones de hidrólisis distan mucho de las condiciones en las que se utilizan en este proyecto, este

estudio sirvió de precedente a la hora de diseñar los experimentos para la optimización de las proporciones de las enzimas principales de *M. thermophila*. Habiendo establecido en el CM 6 cuales eran las enzimas responsables de la mayor parte de la degradación del PCS, se llevó a cabo la optimización de las proporciones de dichas enzimas. De los resultados obtenidos se concluyó el ratio Cbh1/Cbh4 debía ser alto (2,8 en condiciones óptimas). Previamente se había demostrado que un alto ratio de CbhI(GH7)/CbhII(GH6) es más beneficioso para la hidrólisis de la paja de trigo que un ratio bajo (Rosgaard y col., 2007). Sin embargo, mientras que la EG de *T. reesei* parece ser de gran importancia para la hidrólisis de la paja de trigo, la Eg2 de *M. thermophila* no es tan necesaria, y según la predicción estadística es preferible disminuir su proporción a favor de las celobiohidrolasas. Este resultado coincide con la conclusión alcanzada en el experimento de evaluación de la influencia individual de las enzimas (Apartado 4.5.2) donde se demostraba que la eliminación de la Eg2 del cóctel sintético CM 6, suponía una bajada de rendimiento menor que otras enzimas.

Las nuevas proporciones optimizadas aumentaron la liberación de glucosa en más de un 10%, lo que demuestra que una estrategia de diseño estadístico de mezclas para el desarrollo de un cóctel mínimo puede reducir el uso de enzimas y maximizar el rendimiento de la hidrólisis de PCS. El modelo tiene un coeficiente  $R^2$  de 0,895, mientras que el estadístico  $R^2$  ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 61,5%. La baja correlación presente en el modelo es probablemente debida a que el programa no tiene en cuenta el factor de sinergia entre enzimas. Se han descrito cuatro tipos de sinergismo en los sistemas celulolíticos: (1) sinergismo entre endocelulasas y exocelulasas, (2) sinergismo entre celobiohidrolasas que actúan sobre extremos reductores y aquellas que actúan sobre extremos no reductores, (3) sinergismo entre endocelulasas procesivas y endo- o exocelulasas, y (4) sinergismo entre  $\beta$ -glucosidasas y otras celulasas (Vuong y col., 2009). En concreto, las enzimas CBH Ia (Cbh1) y CBH IIb (Cbh4) muestran un factor de sinergismo de 2,75 (Gusakov y col., 2007). Además habría que tener en cuenta dos tipos más de sinergismo: el demostrado en experimentos anteriores entre las enzimas PMO-06230 y PMO-04725 y el que existe entre éstas con las celulasas. Este fenómeno depende de varios factores, incluido las propiedades fisicoquímicas del sustrato y el ratio individual de cada enzima.

Aunque durante muchos años se ha defendido la idea de un cóctel versátil que sea eficiente en la hidrólisis de distintos materiales, tras los resultados obtenidos en distintos proyectos este grupo aboga por la importancia de un cóctel “a medida” cuyas enzimas y proporciones se vean optimizadas para el sustrato a hidrolizar. Karnaouri y col. (2016) llegaron a esta conclusión tras la hidrólisis de distintos sustratos con mezclas artificiales de distintas enzimas de *M. thermophila* (expresadas en *P. pastoris*) donde en función de sustrato lignocelulósico se obtenían resultados distintos.

### 5.4.3 Efecto del dominio de unión a carbohidratos de la enzima Cbh1 en la hidrólisis de PCS

La estructura de una gran número de celulasas está comprendida por un dominio catalítico y un dominio de unión a carbohidratos (CBD) conectados por un péptido de unión. Tradicionalmente se ha sostenido que la presencia del CBD de las celulasas en la hidrólisis de la celulosa favorece la unión a la misma, lo que supone una mejora en el rendimiento de la sacarificación. El propósito principal del CBD es aumentar la concentración de enzima sobre los polímeros de celulosa de manera que dirigen el módulo catalítico hacia el sustrato y de esta manera se mejora la actividad de la enzima (Tomme y col., 1988).

Recientemente se han publicado varios estudios que defienden que la presencia del CBD de las celulasas no supone un claro beneficio cuando se trabaja a elevadas concentraciones de sólidos totales, como en el caso de la hidrólisis de biomasa lignocelulósica industrial. Le Costaouëc y col. (2013) llevaron a cabo hidrólisis de Avicel y distintos materiales lignocelulósicos a concentraciones crecientes de sólidos totales con celulasas con y sin CBD de *T. reesei* y *T. aurantiacus*. Concluyeron que las celulasas que no poseían CBD obtenían peores rendimientos a baja concentración de sólidos totales en comparación con las celulasas que poseían CBD, sin embargo, a altas concentraciones de sólidos totales (20-25%) las diferencias se amortiguaban, encontrando en algunos casos valores idénticos de rendimiento. La hipótesis planteada para este fenómeno fue que la menor disponibilidad de agua en el hidrolizado mejora la probabilidad de las enzimas de encontrar el sustrato de manera que se compensa la menor afinidad del módulo catalítico al sustrato. Además, en el caso de la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos la unión inespecífica e improductiva se daba claramente en menor medida en las celulasas que no poseían CBD. La presencia de lignina en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica supone uno de los mayores obstáculos para la actuación de las enzimas ya que ésta sufren adsorción a la lignina durante la hidrólisis y tras la finalización de ésta (Rahikainen y col., 2013). En experimentos posteriores, donde se llevó a cabo la hidrólisis de paja de trigo pretratada con celulasas con y sin CBD al 20% de sólidos totales, se obtuvo una disminución del 10% de rendimiento cuando se utilizaban celulasas sin CBD (Pakarinen y col., 2014). Adicionalmente la hidrólisis parecía verse ralentizada cuando se utilizaban celulasas sin CBD. A pesar de la disminución del rendimiento, los autores defienden el uso de celulasas sin CBD debido a su facilidad para el reciclado, pudiendo recuperar hasta un 80% de las celulasas sin CBD frente a un 35% de las celulasas con CBD.

Ante estos precedentes y debido a que en el cóctel secretado por *M. thermophila* C1 existen dos isoformas de la Cbh1, con y sin CBD, se decidió estudiar la importancia del papel del CBD en la hidrólisis de PCS. Para ello se llevó a cabo la hidrólisis al 20% de sólidos totales con el cóctel sintético CM 6, sustituyendo parcialmente la enzima Cbh1 con CBD por la isoforma sin CBD. Los resultados obtenidos en este experimento demuestran una brecha mucho mayor entre el

rendimiento de las celulasas con y sin CBD de la que hasta ahora se había publicado. En el caso de la Cbh1 con CBD de *M. thermophila* C1, la sustitución completa por la isoforma sin CBD supone una disminución del rendimiento de casi un 20% (Figura 4.24). Se puede observar una correlación directa entre el rendimiento en glucosa de la hidrólisis y la proporción de Cbh1 con CBD presente en el cóctel. Este resultado se mantiene durante todo el proceso de hidrólisis, viéndose ralentizada la liberación de glucosa en las condiciones donde estaba presente la isoforma Cbh1 sin CBD. Debido a estos resultados se concluye la extrema importancia del CBD de la enzima Cbh1 en el cóctel de *M. thermophila* C1, contradiciendo los resultados anteriores en los que las diferencias de rendimiento entre las enzimas con y sin CBD se veían atenuadas a altas concentraciones de sólidos totales.

Respecto al reciclado de las enzimas, en esta tesis no se llevó a cabo ninguna experimentación. Sin embargo, según el modelo de la planta industrial para la cual se realiza el proyecto de mejora del cóctel enzimático de *M. thermophila* C1, no parece viable la recuperación de las celulasas, por lo que por ahora no parece una ventaja a tener en cuenta.

Como trabajos futuros se propone la optimización de las condiciones de cultivo para aumentar la proporción Cbh1 con CBD frente a la Cbh1 sin CBD. Se conoce experimentalmente que la proporción de las isoformas de la enzima Cbh1 con y sin CBD depende de las condiciones de cultivo que pueden provocar la ruptura proteolítica del péptido de unión, dando como resultado el dominio catalítico libre de la enzima Cbh1. Por tanto, la optimización de dichas condiciones de cultivo parece una solución prometedora para evitar la pérdida de rendimiento en hidrólisis que provoca la aparición de enzima Cbh1 sin CBD.

## 5.5 Mejora en la hidrólisis de hemicelulosa

La hemicelulosa disponible en un material lignocelulósico pretratado va a depender tanto de su composición como del tipo de pretratamiento utilizado. Cuanto más severo es el pretratamiento del material más degradada se encontrará la hemicelulosa (Hendriks y col., 2009). En el caso del de PCS utilizado en este trabajo, la hemicelulosa disponible es aproximadamente un 6,5% del total de polisacáridos presentes en la muestra. La hidrólisis de este material realizada por el cóctel producido por *M. thermophila* C1 en biorreactor de 30 L, no alcanza a completar la degradación de la hemicelulosa, dejando alrededor de un 50% de xilobiosa no hidrolizada según se demostró en los resultados dentro del apartado 4.7 (Figura 4.25). Este cuello de botella en la hidrólisis del material lignocelulósico se debe a que el cóctel es deficitario en actividad  $\beta$ -xilosidasa debido a la baja representación de sus enzimas endógenas. Para abordar el problema del déficit de actividad  $\beta$ -xilosidasa del cóctel producido por *M. thermophila* C1, se decidió llevar a cabo un escrutinio de enzimas  $\beta$ -xilosidasas de otros hongos celulolíticos, dando prioridad a aquellos hongos con alta actividad específica  $\beta$ -xilosidasa, y que debido a su objetivo final dentro del

proceso de hidrólisis industrial fuesen termorresistentes a las condiciones de proceso así como un pH óptimo en el rango dentro del cual se produce la hidrólisis (pH 5,2 – 4,5). La importancia de estas características de la enzima es fundamental para un buen rendimiento de la hidrólisis de la hemicelulosa global en las condiciones definidas en este proyecto. Otros autores han expresado en plataformas fúngicas diversas enzimas  $\beta$ -xilosidasas (Mustafa y col., 2016), sin embargo, las características de estas enzimas o no son las óptimas para nuestro proceso, ya que tienen un pH óptimo alejado del rango del pH de hidrólisis o no existen datos de termorresistencia que respalden su uso en procesos industriales. Como criterio final a la hora de seleccionar una enzima para su posterior clonación y expresión en *M. thermophila* C1, se atendió a la cobertura de la identificación por huella peptídica, de manera que aquellas enzimas cuya cobertura no permitió hacer una búsqueda en bases de datos para obtener la secuencia y así generar los cebadores correspondientes, se descartaron. La candidata final fue la Bxl 20.17 cuya secuencia corresponde a la familia GH3. Esta secuencia mostró una alta homología con  $\beta$ -xilosidasas del género *Trichoderma* y comparte los residuos conservados propios de esta familia.

#### 5.5.1 Expresión heteróloga del gen *bxl* 20.17 en *M. thermophila* C1

A pesar de que los sistemas de expresión en hongos filamentosos son muy utilizados en la industria, a menudo la expresión heteróloga presenta dificultades, no alcanzando los mismos niveles de producción que se consiguen mediante expresión homóloga (Gouka y col., 1997, Zoglowek y col., 2015). Debido a esto se han desarrollado una serie de estrategias para la mejora de la expresión heteróloga en hongos filamentosos. Algunas de ellas son: aumento del número de copias del gen, optimización del uso de codones y del porcentaje G+C, fusión del gen al extremo 3' de un gen de alta expresión, uso de promotores de alta expresión, uso de péptidos señal de genes con alta secreción, el uso de cepas deficientes en proteasas o cepas superproductoras de chaperonas (Koushki y col., 2011.). De las herramientas aquí planteadas, en el presente trabajo se optó por el uso de promotores de alta expresión y el uso de distintos péptidos señal.

En general, los promotores homólogos fuertes parecen tener mayor expresión que los promotores heterólogos (Nevalainen y col., 2005). La proteína extracelular más representada de *M. thermophila* C1 es Cbh1, suponiendo hasta un 30% del total de proteína secretada. Una evaluación de la expresión de distintos genes demostró que los niveles de expresión de Cbh1 eran claramente los más altos frente a otros dos genes que codificaban para una de las hidrolasas secretadas más representadas (*chi1*) y un gen constitutivo (*his2A*). Por lo tanto, se diseñaron vectores de expresión basados en el promotor de *cbh1* que actualmente son comúnmente utilizado para la expresión de genes recombinantes en *M. thermophila* (Visser y col., 2011). Por este motivo se utilizó este promotor para la expresión heteróloga de Bxl 20.17.

Por otro lado se escogieron distintas estrategias respecto al uso del péptido señal. Éste es responsable de la entrada en la vía de secreción de las proteínas



además de facilitar el correcto plegamiento de la proteína. Existe múltiple bibliografía acerca del uso de distintos péptidos señal para expresión heteróloga en hongos. Algunos autores defienden el uso del péptido señal nativo de la proteína, como Chou y col. (2004), que consiguieron mayores niveles de expresión con el péptido señal de Cel7A de *P. funiculosum* en *A. niger* var. *awamori* que con el péptido señal de la glucoamilasa de *A. niger*. Por otro lado, otros autores respaldan la teoría del uso de un péptido señal de una proteína con altos niveles de expresión como la glucoamilasa de *A. niger* (Gouka y col., 1997). Previamente en nuestro grupo se habían expresado satisfactoriamente de manera heteróloga algunas hemicelulasas, entre ellas una  $\beta$ -xilosidasa de *F. oxysporum* (Díez y col., 2014) o una  $\alpha$ -xilosidasa de *Aspergillus terreus* (Díez y col., 2015). Ambas proteínas se expresaron sustituyendo y fusionando el péptido señal de la glucoamilasa de *A. niger*, por lo que en el presente trabajo se decidió probar tanto esta estrategia como el uso del péptido señal nativo, para la obtención del máximo nivel de expresión de la Bxl 20.17. La mayoría de los clones de la construcción con el péptido señal nativo mostraron actividad  $\beta$ -xilosidasa superior a la del control (Figura 4.33A). Por el contrario, ninguno de los clones de la construcción con el péptido señal de la glucoamilasa de *A. niger* se expresaron, no viendo actividad en el sobrenadante tanto con ensayos colorimétricos como por zimografía. Podría ser debido a que el nuevo péptido señal provoque cambios en la estructura secundaria de la proteína que la hacen inactiva, como proponen Zoglowek y col. (2015) tras revisar una serie de celulasas que se expresan exclusivamente con el péptido señal nativo. Estas evidencias indican que la eficiencia de secreción probablemente dependa de la correlación exacta entre el péptido señal, la proteína recombinante y el sistema de reconocimiento de péptidos del huésped.

En los ensayos de selección en microplaca se encontró que la mayoría de los clones con el péptido señal nativo sufrían un leve aumento en su actividad a pH 5,0 frente a 4,5 (pH óptimo de la enzima Bxl 20.17). De experimentos anteriores se conoce que el pH óptimo de la actividad Bxl del cóctel de *M. thermophila* C1 está desplazado hacia 6,0-6,5, sin embargo, este hecho no explica el aumento de actividad de los clones a pH 5,0. En el zimograma de los clones seleccionados se pudo corroborar la presencia de una proteína con actividad Bxl de alto peso molecular, de mayor tamaño que la  $\beta$ -xilosidasa endógena (Figura 4.33B). Estos datos confirman el tamaño teórico de la  $\beta$ -xilosidasa endógena de 78 kDa y el de Bxl 20.17 de 88 kDa.

La producción de proteína de las fermentaciones en matraz, tanto de los transformantes como del control sin transformar, fue ligeramente inferior a los valores que suelen alcanzarse con *M. thermophila* C1 y el medio utilizado. Sin embargo, los valores de actividad normalizada a la cantidad de proteína sí correspondían a los observados anteriormente. Tomando esos datos de referencia, el clon 2D11, aquel que obtuvo mayores niveles de actividad, aumentó 60 veces la actividad del control. En todos los clones seleccionados la actividad a pH 4,5 fue superior que a pH 5,0, superando hasta en 100 U/g en el caso del clon 2D11. Este comportamiento concuerda con el visto anteriormente en la curva de pH realizada, donde el óptimo se encontraba a pH 4,5.

### 5.5.2 Hidrólisis de PCS por los transformantes de *bxl* 20.17

Aunque la actividad de la  $\beta$ -xilosidasa de *Trichoderma* transformada en *M. thermophila* C1 del clon 2D11 ha conseguido degradar prácticamente la totalidad de la xilobiosa presente en el hidrolizado, no se alcanzan los valores de conversión a xilosa esperados. Mientras que dicho clon aumenta su capacidad hidrolítica de xilobiosa en 10 veces, la capacidad de producir xilosa es tan sólo de 1,5 veces superior (Figura 4.35). Comparativamente con otras  $\beta$ -xilosidasas expresadas por este grupo en *M. thermophila* C1, esta capacidad sería similar a la de la cepa que expresa una  $\beta$ -xilosidasa de *H. insolens* e inferior a la que expresa la  $\beta$ -xilosidasa de *F. oxysporum* (Díez y col., 2014). Sin embargo, estas proteínas fueron expresadas en una cepa distinta a la usada en esta tesis.

La posible explicación para que la hidrólisis de xilobiosa no se traduzca en mayor liberación de xilosa puede ser debida a que pueden existir oligómeros de xilosa de mayor tamaño a los que la  $\beta$ -xilosidasa no puede acceder. Para alcanzar dichos valores de conversión se necesitaría contar con enzimas aguas arriba que sean capaces de degradar el xilano presente en el PCS. Desde esta tesis se plantea la hipótesis de que la cepa base usada para la transformación de la  $\beta$ -xilosidasa no tenga los niveles de expresión suficientes de PMO, en concreto de la PMO-06230. Como ya se avanzó en la introducción, las enzimas PMO, además de la ampliamente conocida función de realizar cortes oxidativos en las cadenas de celulosa, pueden igualmente actuar sobre la hemicelulosa, en concreto en los polímeros de xilano y xiloglucano (Agger y col., 2014, Frommhagen y col., 2015). Mayores niveles de actividad de esta enzima darían lugar a concentraciones más elevadas de xilobiosa en el hidrolizado y por consiguiente, tras la actuación de la enzima Bxl 20.17, mayores niveles de xilosa. La suposición de la falta de PMO en los transformantes se respalda con los datos de liberación de glucosa. Como se vio previamente en los experimentos de cóctel mínimo, la falta de la enzima PMO-06230 en la hidrólisis del material lignocelulósico disminuía el rendimiento de glucosa un 23% frente al control con las 6 enzimas principales (Figura 4.22), demostrando la importancia de la actuación de esta enzima. En la hidrólisis del PCS con los transformantes de Bxl 20.17, ninguno de estos alcanza los valores de glucosa del control, manifestando la falta de actividades celulolíticas en el cóctel enzimático secretado por los transformantes frente al control sin transformar. Sin embargo, esta hipótesis ha de ser demostrada en futuros trabajos, así como demostrar que una vez se cuente con una cepa base óptima tanto para la degradación de xilano como de glucano, los niveles de expresión de Bxl 20.17 sean suficientes.



## **6 CONCLUSIONES**



1. Se purificó una enzima  $\beta$ -glucosidasa de la familia GH3 del caldo de cultivo del biorreactor de *Myceliophthora thermophila* C1. Esta enzima, denominada como Bgl1, tuvo un comportamiento bifásico en la caracterización cinética con pNGP, comportamiento observado en otras  $\beta$ -glucosidasas, mientras que con celobiosa como sustrato, la cinética se ajustó al modelo de Michaelis-Mentel, La inhibición por glucosa mostró ser competitiva con una  $K_i$  similar a las publicadas en la bibliografía. Esta enzima demostró tener un pH y temperatura óptima dentro del rango de las condiciones de proceso industrial, siendo termorresistente a dichas condiciones y haciéndola una candidata idónea para su uso en la hidrólisis de PCS.
2. Se purificó una enzima celobiohidrolasa de la familia GH7 del caldo de cultivo del biorreactor de *M. thermophila* C1. Esta enzima, denominada como Cbh1, se caracterizó con el sustrato soluble pNCB, cuyas constantes se encontraron dentro de rango de las publicadas en la bibliografía, y con el sustrato celulósico Avicel, para el cual demostró ser más activa. La inhibición por celobiosa en ambos caso fue competitiva sin presentar inhibición por glucosa. Esta enzima demostró tener un pH y temperatura óptima dentro del rango de las condiciones de proceso industrial, siendo termorresistente a dichas condiciones y haciéndola una candidata idónea para su uso en la hidrólisis de PCS. Los datos publicados anteriormente de esta enzima no concuerdan en ciertos casos con los presentados en esta tesis, probablemente por las distintas modificaciones postraduccionales dependientes de las condiciones de cultivo.
3. Se purificó una enzima celobiohidrolasa de la familia GH6 del caldo de cultivo del biorreactor de *M. thermophila* C1. Esta enzima, denominada como Cbh4, no mostró actividad frente al sustrato soluble pNCB, siendo caracterizada usando el sustrato celulósico Avicel. La enzima Cbh4 demostró ser más activa frente a Avicel que la enzima Cbh1, pero menos afin. La inhibición por celobiosa fue competitiva, sin presentar inhibición por glucosa. La temperatura óptima de la enzima demostró ser superior a la de las condiciones de proceso industrial, mientras que el pH óptimo se encontró dentro de rango. La enzima no resultó ser termoestable a las condiciones de dicho proceso.
4. Se purificó una enzima endoglucanasa de la familia GH5 del caldo de cultivo del biorreactor de *M. thermophila* C1 con alta actividad específica frente al sustrato azo-CMC y baja frente a Avicel. No se pudo llevar a cabo la caracterización cinética de esta enzima, denominada como Eg2, por no existir sustratos modelos adecuados para ello. La enzima Eg2 no mostró ser inhibida por glucosa y presentó inhibición por celobiosa. Esta enzima demostró tener un pH y temperatura óptima dentro del rango de las condiciones de proceso industrial, siendo termorresistente a dichas condiciones y haciéndola una candidata idónea para su uso en la hidrólisis de PCS.

5. Se ha confirmado que la suplementación de distintas enzimas con actividad PMO, procedentes del caldo de cultivo de *M. thermophila* C1, sobre un cóctel sintético compuesto por las principales celulasas de este organismo, supone una gran mejora del rendimiento en liberación de glucosa de en la hidrólisis del PCS. Asimismo se ha demostrado el sinergismo en la actividad de distintas enzimas PMO.
6. Se ha demostrado que existe una combinación de cuatro enzimas celulasas y dos enzimas PMO con la cual se alcanza el 100% del rendimiento del cóctel industrial en la hidrólisis del PCS. Asimismo se han encontrado unas proporciones de dichas enzimas con las que el rendimiento supera al del cóctel industrial en un 10%.
7. Se ha establecido la contribución de cada una de las enzimas presentes en el cóctel mínimo en la hidrólisis del PCS, siendo las de mayor importancia las enzimas Cbh1, PMO-06230 y Bgl1.
8. En contra de las hipótesis en las que se afirma que, en condiciones de hidrólisis enzimática a altos sólidos totales las diferencias de rendimiento entre las enzimas con y sin CBD se veían atenuadas, se ha demostrado una correlación directa entre el rendimiento en glucosa de la hidrólisis de PCS y la proporción de Cbh1 con CBD presente en el cóctel frente a la isoforma sin CBD.
9. Del escrutinio de enzimas con actividad  $\beta$ -xilosidasa en hongos celulolíticos se seleccionó una enzima de la familia GH3 del género *Trichoderma* con alta actividad y cuyas características la hacían apropiada para su uso en el proceso de hidrólisis de PCS.
10. Se expresó heterológamente una proteína  $\beta$ -xilosidasa, denominada Bxl 20.17, en la plataforma de expresión *M. thermophila* C1, mediante la estrategia de uso del péptido señal nativo de esta proteína. El caldo de cultivo de los transformantes presentaba alta actividad  $\beta$ -xilosidasa.
11. Los clones transformados de *M. thermophila* C1 con el gen *bxl* 20.17 consiguieron aumentar 10 veces la capacidad hidrolítica de la xilobiosa durante la hidrólisis del PCS. La liberación de xilosa estuvo por debajo de los valores esperados, probablemente debido a la falta de expresión en la cepa transformada de enzimas que degraden los oligómeros de xilosa de mayor tamaño.

## **7 BIBLIOGRAFÍA**

- Agger, J. W., Isaksen, T., Várnai, A., Vidal-Melgosa, S., Willats, W. G., Ludwig, R., ... & Westereng, B. (2014). Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), 6287-6292.
- Ai, Y. C., & Wilson, D. B. (2002). Mutation and expression of N233C-D506C of cellulase Cel6B from *Thermobifida fusca* in *Escherichia coli*. *Enzyme and microbial technology*, 30(6), 804-808.
- Akcapinar, G. B., Venturini, A., Martelli, P. L., Casadio, R., & Sezerman, U. O. (2015). Modulating the thermostability of Endoglucanase I from *Trichoderma reesei* using computational approaches. *Protein Engineering Design and Selection*, 28(5), 127-135.
- Anbar, M., Lamed, R., & Bayer, E. A. (2010). Thermostability enhancement of *Clostridium thermocellum* cellulosomal endoglucanase Cel8A by a single glycine substitution. *ChemCatChem*, 2(8), 997-1003.
- Aro, N., Pakula, T., & Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 719-739.
- Asha, P., Divya, J., & Singh, I. B. (2016). Purification and characterisation of processive-type endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 through saccharification of delignified coir pith to glucose. *Bioresource technology*. 213, 245-248.
- Badieyan, S., Bevan, D. R., & Zhang, C. (2012). Study and design of stability in GH5 cellulases. *Biotechnology and bioengineering*, 109(1), 31-44.
- Baldrian, P., & Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS microbiology reviews*, 32(3), 501-521.
- Bauer, S., Vasu, P., Persson, S., Mort, A. J., & Somerville, C. R. (2006). Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11417-11422.
- Beeson, W. T., Vu, V. V., Span, E. A., Phillips, C. M., & Marletta, M. A. (2015). Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. *Annual review of biochemistry*, 84, 923-946.
- Belancic, A., Gunata, Z., Vallier, M. J., & Agosin, E. (2003).  $\beta$ -glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces hansenii*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(5), 1453-1459.

- Berghem, L. E., & Pettersson, L. G. (1974). The mechanism of enzymatic cellulose degradation. *European Journal of Biochemistry*, 46(2), 295-305.
- Berka, R. M., Grigoriev, I. V., Otilar, R., Salamov, A., Grimwood, J., Reid, I., ... & Henrissat, B. (2011). Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nature biotechnology*, 29(10), 922-927.
- Bey, M., Zhou, S., Poidevin, L., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Berrin, J. G., & Sigoillot, J. C. (2013). Cello-oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (family GH61) from *Podospora anserina*. *Applied and environmental microbiology*, 79(2), 488-496.
- Bezerra RMF, Dias AA. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis e inhibition by ethanol and cellobiose. *Appl Biochem Biotechnol* 2005;126(1):49e59.
- Bhatti, H. N., Batool, S., & Afzal, N. (2013). Production and Characterization of a Novel  $\beta$ -Glucosidase from *Fusarium solani*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 15(1).
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6), 1633-1649.
- Bohlin, C., Praestgaard, E., Baumann, M. J., Borch, K., Praestgaard, J., Monrad, R. N., & Westh, P. (2013). A comparative study of hydrolysis and transglycosylation activities of fungal  $\beta$ -glucosidases. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(1), 159-169.
- Börjesson J, Petersson R, Tjerneld F. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by polyethylene glycoladdition. *Enzyme Microb Techno* 2007;40(4):754e62.
- Bukhtojarov, F. E., Ustinov, B. B., Salanovich, T. N., Antonov, A. I., Gusakov, A. V., Okunev, O. N., & Sinitsyn, A. P. (2004). Cellulase complex of the fungus *Chrysosporium lucknowense*: isolation and characterization of endoglucanases and cellobiohydrolases. *Biochemistry (Moscow)*, 69(5), 542-551.
- Cardona, C. A., & Sánchez, Ó. J. (2007). Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource technology*, 98(12), 2415-2457.
- Chauve, M., Mathis, H., Huc, D., Casanave, D., Monot, F., & Ferreira, N. (2010). Comparative kinetic analysis of two fungal  $\beta$ -glucosidases. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 1.
- Chen, H., & Fu, X. (2016). Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57, 468-478.

- Chen, H., Hayn, M., & Esterbauer, H. (1992). Purification and characterization of two extracellular  $\beta$ -glucosidases from *Trichoderma reesei*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1121(1-2), 54-60.
- Chen, P., Fu, X., Ng, T. B., & Ye, X. Y. (2011). Expression of a secretory  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its characterization. *Biotechnology letters*, 33(12), 2475-2479.
- Choi, J. Y., Park, A. R., Kim, Y. J., Kim, J. J., Cha, C. J., & Yoon, J. J. (2011). Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase produced by *Phoma* sp. KCTC11825BP isolated from rotten mandarin peel. *Journal of microbiology and biotechnology*, 21(5), 503-508.
- Chou, Y. C., Adney, W. S., Decker, S. R., Baker, J. O., Kunkel, G., Templeton, D. W., & Himmel, M. E. (2004). Cloning and heterologous expression of the gene encoding a family 7 glycosyl hydrolase from *Penicillium funiculosum*.
- Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B. J., Claeysens, M., & Bhat, M. K. (1995). Purification and mode of action of a low molecular mass endo-1, 4- $\beta$ -D-glucanase from *Fusarium oxysporum*. *Journal of biotechnology*, 39(1), 85-93.
- Colussi, F., Serpa, V., Delabona, P. D. S., Manzine, L. R., Voltatodio, M. L., Alves, R., ... & Santos, M. A. M. (2011). Purification, and biochemical and biophysical characterization of cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum* IOC 3844. *J Microbiol Biotechnol*, 21(8), 808-817.
- Covert, S. F., Bolduc, J., & Cullen, D. (1992). Genomic organization of a cellulase gene family in *Phanerochaete chrysosporium*. *Current genetics*, 22(5), 407-413.
- Daroit, D. J., Simonetti, A., Hertz, P. F., & Brandelli, A. (2008). Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from *Monascus purpureus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(5), 933-941.
- Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int J Biol Sci*, 5(6), 578-595.
- De Souza, W. R. (2013). Microbial degradation of lignocellulosic biomass. *Chandel A, Da Silva, S. Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization. Brazil: InTech*.
- De Vries, R. P., & Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(4), 497-522.
- Deshpande, M. V., Eriksson, K. E., & Pettersson, L. G. (1984). An assay for selective determination of exo-1, 4- $\beta$ -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. *Analytical biochemistry*, 138(2), 481-487.



- Díez, B., Crespo, N., Sosa, F., Moreno, A.J., ...Benítez, L. & Morales, M. (2016). *Improved variants of cellobiohydrolase 1*. Patente WO2016162587
- Díez, B., Rodríguez, A., Gil, J., Moreno, A.J., ...Gómez, P. & Arjona, R. (2014). *Expression of recombinant beta-xylosidase enzymes*. Patente WO2014188012
- Díez, B., Rodríguez, A., Gil, J., Moreno, A.J., ...Gómez, P. & Arjona, R. (2015). *Myceliophthora thermophila host cell expressing a heterologous alpha-xilosidase enzyme and use thereof in a method for the degradation biomass*. Patente WO 2015011319
- Dimarogona, M., Topakas, E., & Christakopoulos, P. (2012). Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3), 1-8.
- Do BC, Dang TT, Berrin JG, Haltrich D, To KA, Sigoillot JC, Yamabhai M (2009) Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-betamannosidase from *Aspergillus niger* BK01. *Microb Cell Fact* 8:59
- Dodd, D., Kiyonari, S., Mackie, R. I., & Cann, I. K. (2010). Functional diversity of four glycoside hydrolase family 3 enzymes from the rumen bacterium *Prevotella bryantii* B14. *Journal of bacteriology*, 192(9), 2335-2345.
- Dong, X. Q., Yang, J. S., Zhu, N., Wang, E. T., & Yuan, H. L. (2013). Sugarcane bagasse degradation and characterization of three white-rot fungi. *Bioresource technology*, 131, 443-451.
- Dotsenko, A. S., Gusakov, A. V., Volkov, P. V., Rozhkova, A. M., & Sinitsyn, A. P. (2016). N-linked glycosylation of recombinant cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Penicillium verruculosum* and its effect on the enzyme activity. *Biotechnology and bioengineering*, 113(2), 283-291.
- Emalfarb, M. A., Ben-Bassat, A., Burlingame, R. P., Chernoglazov, V. M., Okounev, O. N., Olson, P. T., ... & Solovjeva, I. V. (1998). *U.S. Patent No. 5,811,381*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Emalfarb, M. A., Punt, P. J., Van Zeijl, C., & van den Hondel, C. (2006). *U.S. Patent No. 7,122,330*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Emalfarb, M. A., Punt, P. J., Van Zeijl, C., van den Hondel, C., Verdoes, J., & Burlingame, R. P. (2014). *U.S. Patent No. 8,680,252*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Europea, C. (2006). Biofuels in the European Union-A vision for 2030 and beyond. *Final draft report of the Biofuels Research Advisory Council*.

- Fang, H., Zhao, C., & Song, X. Y. (2010). Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. *Bioresource technology*, 101(11), 4111-4119.
- Foreman, P. K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N. S., ... & Meerman, H. J. (2003). Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 31988-31997.
- Frolkova, A. K., & Raeva, V. M. (2010). Bioethanol dehydration: state of the art. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*, 44(4), 545-556.
- Frommhagen, M., Koetsier, M. J., Westphal, A. H., Visser, J., Hinz, S. W., Vincken, J. P., ... & Gruppen, H. (2016). Lytic polysaccharide monooxygenases from *Myceliophthora thermophila* C1 differ in substrate preference and reducing agent specificity. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 186.
- Frommhagen, M., Sforza, S., Westphal, A. H., Visser, J., Hinz, S. W., Koetsier, M. J., ... & Kabel, M. A. (2015). Discovery of the combined oxidative cleavage of plant xylan and cellulose by a new fungal polysaccharide monooxygenase. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), 1.
- Gao, D., Chundawat, S. P., Krishnan, C., Balan, V., & Dale, B. E. (2010). Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover. *Bioresource technology*, 101(8), 2770-2781.
- García-Aparicio, M. P., Ballesteros, I., González, A., Oliva, J. M., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2006). Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. In *Twenty-seventh symposium on biotechnology for fuels and chemicals* (pp. 278-288). Humana Press.
- Gomez, L. D., Steele-King, C. G., & McQueen-Mason, S. J. (2008). Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytologist*, 178(3), 473-485.
- Gough, J., Karplus, K., Hughey, R., & Chothia, C. (2001). Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *Journal of molecular biology*, 313(4), 903-919.
- Gouka, R. J., Punt, P. J., & Van Den Hondel, C. A. M. J. J. (1997). Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 47(1), 1-11.
- Grinna, L. S., & Tschopp, J. F. (1989). Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast*, 5(2), 107-115.

- Gruno, M., Våljamäe, P., Pettersson, G., & Johansson, G. (2004). Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(5), 503-511.
- Gupta, A., & Verma, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 550-567.
- Gusakov, A. V., Antonov, A. I., & Ustinov, B. B. (2008). N-Glycosylation in *Chrysosporium lucknowense* enzymes. *Carbohydrate research*, 343(1), 48-55.
- Gusakov, A. V., Salanovich, T. N., Antonov, A. I., Ustinov, B. B., Okunev, O. N., Burlingame, R., ... & Sinitsyn, A. P. (2007). Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and bioengineering*, 97(5), 1028-1038.
- Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Salanovich, T. N., Bukhtojarov, F. E., Markov, A. V., Ustinov, B. B., ... & Burlingame, R. (2005). Purification, cloning and characterisation of two forms of thermostable and highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) produced by the industrial strain of *Chrysosporium lucknowense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(1), 57-69.
- H.M. Hassan, Abeer A. Keera and M.Fadel (2016). High-yield Cellulases and Xylanase Production from Sugar-cane Bagasse Pith by *Aspergillus oryzae* FK-923 Cultivated under Solid State Fermentation. *Int.J.Curr.Res.Aca.Rev.*2016; 4(1): 1-13
- Harner, N. K., Wen, X., Bajwa, P. K., Austin, G. D., Ho, C. Y., Habash, M. B., ... & Lee, H. (2015). Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 42(1), 1-20.
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 100(1), 10-18.
- Henriksson, G., Nutt, A., Henriksson, H., Pettersson, B., Ståhlberg, J., Johansson, G., & Pettersson, G. (1999). Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. *European journal of biochemistry*, 259(1-2), 88-95.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280(2), 309-316.
- Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *science*, 315(5813), 804-807.
- Hong, J., Tamaki, H., Yamamoto, K., & Kumagai, H. (2003). Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(1), 42-50.

- Hu, J., Arantes, V., Pribowo, A., & Saddler, J. N. (2013). The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 1.
- Igarashi, K., Samejima, M., & Eriksson, K. E. L. (1998). Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase I activity by relieving product inhibition. *European journal of biochemistry*, 253(1), 101-106.
- Jalak, J., Kurašin, M., Teugjas, H., & Väljamäe, P. (2012). Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited. *Journal of Biological Chemistry*, 287(34), 28802-28815.
- Jeya, M., Joo, A. R., Lee, K. M., Tiwari, M. K., Lee, K. M., Kim, S. H., & Lee, J. K. (2010). Characterization of  $\beta$ -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1473-1484.
- Johansen, K. S. (2016). Lytic Polysaccharide Monooxygenases: The Microbial Power Tool for Lignocellulose Degradation. *Trends in Plant Science*, 21(11), 926-936.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., ... & Pesseat, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.
- Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R., & Brunak, S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*, 15(2), 153-164.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188-203.
- Kanamasa, S., Mochizuki, M., Takada, G., Kawaguchi, T., Sumitani, J. I., & Arai, M. (2003). Overexpression of *Aspergillus aculeatus* cellobiohydrolase I in *Aspergillus oryzae*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 95(6), 627-629.
- Kanna, M., Yano, S., Inoue, H., Fujii, T., & Sawayama, S. (2011). Enhancement of  $\beta$ -xylosidase productivity in cellulase producing fungus *Acremonium cellulolyticus*. *AMB express*, 1(1), 1.
- Karnaouri, A. C., Topakas, E., & Christakopoulos, P. (2014a). Cloning, expression, and characterization of a thermostable GH7 endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* capable of high-consistency enzymatic liquefaction. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(1), 231-242.
- Karnaouri, A., Matsakas, L., Topakas, E., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2016). Development of Thermophilic Tailor-Made Enzyme Mixtures for the Bioconversion of Agricultural and Forest Residues. *Frontiers in microbiology*, 7.

- Karnaouri, A., Topakas, E., Antonopoulou, I., & Christakopoulos, P. (2014b). Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*. *Front Microbiol*, 5, 281.
- Karnaouri, A., Topakas, E., Paschos, T., Taouki, I., & Christakopoulos, P. (2013). Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3  $\beta$ -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. *PeerJ*, 1, e46.
- Kaur, J., Chadha, B. S., Kumar, B. A., & Saini, H. S. (2007). Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Bioresource Technology*, 98(1), 74-81.
- Kim, E. S., Lee, H. J., Bang, W. G., Choi, I. G., & Kim, K. H. (2009). Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5), 1342-1353.
- Kim, I. J., Lee, H. J., Choi, I. G., & Kim, K. H. (2014). Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(20), 8469-8480.
- Kitpreechavanich, V., Hayashi, M., Kumagai, H., & Nagai, S. (1986). Purification and characterization of extracellular  $\beta$ -xylosidase and  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*. *Agricultural and biological chemistry*, 50(7), 1703-1711.
- Kojima, Y., Várnai, A., Ishida, T., Sunagawa, N., Petrovic, D. M., Igarashi, K., ... & Eijsink, V. G. (2016). A Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Xyloglucan Specificity from the Brown-Rot Fungus *Gloeophyllum trabeum* and Its Action on Cellulose-Xyloglucan Complexes. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(22), 6557-6572.
- Koushki, M. M., Rouhani, H., & Farsi, M. (2011). Genetic manipulation of fungal strains for the improvement of heterologous genes expression (a mini-review). *African Journal of Biotechnology*, 10(41), 7939-7948.
- Kristensen, J. B., Thygesen, L. G., Felby, C., Jørgensen, H., & Elder, T. (2008). Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnology for biofuels*, 1(1), 5.
- Krogh, K. B., Harris, P. V., Olsen, C. L., Johansen, K. S., Hojer-Pedersen, J., Borjesson, J., & Olsson, L. (2010). Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium brasilianum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(1), 143-154.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011.

- Lagaert, S., Pollet, A., Courtin, C. M., & Volckaert, G. (2014).  $\beta$ -Xylosidases and  $\alpha$ -l-arabinofuranosidases: Accessory enzymes for arabinoxylan degradation. *Biotechnology advances*, 32(2), 316-332.
- Lahjouji, K., Storms, R., Xiao, Z., Joung, K. B., Zheng, Y., Powlowski, J., ... & Varin, L. (2007). Biochemical and molecular characterization of a cellobiohydrolase from *Trametes versicolor*. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(2), 337-346.
- Lavigne, J. A., Hill, C. M., Tremblay, A., St-Pierre, P., & Tomashek, J. J. (2011). *U.S. Patent No. 8,012,734*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Le Costaouëc, T., Pakarinen, A., Várnai, A., Puranen, T., & Viikari, L. (2013). The role of carbohydrate binding module (CBM) at high substrate consistency: comparison of *Trichoderma reesei* and *Thermoascus aurantiacus* Cel7A (CBHI) and Cel5A (EGII). *Bioresource technology*, 143, 196-203.
- Lee, K. M., Jeya, M., Joo, A. R., Singh, R., Kim, I. W., & Lee, J. K. (2010). Purification and characterization of a thermostable endo- $\beta$ -1, 4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(3), 206-211.
- Lee, K. M., Joo, A. R., Jeya, M., Lee, K. M., Moon, H. J., & Lee, J. K. (2011). Production and Characterization of Cellobiohydrolase from a Novel Strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Applied biochemistry and biotechnology*, 163(1), 25-39.
- Lee, T. M., Farrow, M. F., Arnold, F. H., & Mayo, S. L. (2011). A structural study of *Hypocrea jecorina* Cel5A. *Protein Science*, 20(11), 1935-1940.
- Leggio, L. L., & Larsen, S. (2002). The 1.62 Å structure of *Thermoascus aurantiacus* endoglucanase: completing the structural picture of subfamilies in glycoside hydrolase family 5. *FEBS letters*, 523(1), 103-108.
- Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 1.
- Liang, C., Fioroni, M., Rodríguez-Ropero, F., Xue, Y., Schwaneberg, U., & Ma, Y. (2011). Directed evolution of a thermophilic endoglucanase (Cel5A) into highly active Cel5A variants with an expanded temperature profile. *Journal of biotechnology*, 154(1), 46-53.
- Limam, F., Chaabouni, S. E., Ghir, R., & Marzouki, N. (1995). Two cellobiohydrolases of *Penicillium occitanis* mutant Pol 6: Purification and properties. *Enzyme and microbial technology*, 17(4), 340-346.



- Lindedam, J., Haven, M. Ø., Chylenski, P., Jørgensen, H., & Felby, C. (2013). Recycling cellulases for cellulosic ethanol production at industrial relevant conditions: potential and temperature dependency at high solid processes. *Bioresource technology*, 148, 180-188.
- Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Xu, Y., Tang, Z., Tian, W., & Shen, Q. (2011). Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost. *Protein expression and purification*, 79(2), 176-186.
- Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Zhang, Z., Song, S., Miao, Y., & Shen, Q. (2012). Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial cell factories*, 11(1), 1.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 506-577.
- Macarron, R., Acebal, C., Castillon, M. P., Dominguez, J. M., De la Mata, I., Pettersson, G., ... & Claeysens, M. (1993). Mode of action of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *Biochemical journal*, 289(3), 867-873.
- Marjamaa, K., Toth, K., Bromann, P. A., Szakacs, G., & Kruus, K. (2013). Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. *Enzyme and microbial technology*, 52(6), 358-369.
- Martin Alonso, D., Wettstein, S. G., Dumestic, J. A., 2012. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 8075-8098
- Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., & Folch-Mallol, J. L. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3), 119-131.
- Master ER, Zheng Y, Storms R, Tsang A, Powlowski J (2008) A xyloglucan-specific family 12 glycosyl hydrolase from *Aspergillus niger*: recombinant expression, purification and characterization. *Biochem J* 411(1):161–170
- Matsakas, L., Antonopoulou, I., & Christakopoulos, P. (2015). Evaluation of *Myceliophthora thermophila* as an enzyme factory for the production of thermophilic cellulolytic enzymes. *BioResources*, 10(3), 5140-5158.
- Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T., & Sawayama, S. (2009). Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 37-53.

- McCleary, B. V. (1980). New chromogenic substrates for the assay of alpha-amylase and (1→4)-β-D-glucanase. *Carbohydrate research*, 86(1), 97-104.
- Meyer, A. S., Rosgaard, L., & Sørensen, H. R. (2009). The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *Journal of Cereal Science*, 50(3), 337-344.
- Moysés, D. N., Reis, V. C. B., Almeida, J. R. M. D., Moraes, L. M. P. D., & Torres, F. A. G. (2016). Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 207.
- Mustafa, G., Kousar, S., Rajoka, M. I., & Jamil, A. (2016). Molecular cloning and comparative sequence analysis of fungal β-Xylosidases. *AMB Express*, 6(1), 1.
- Naika, G. S., Kaul, P., & Prakash, V. (2007). Purification and characterization of a new endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(18), 7566-7572.
- Nakkharat, P., & Haltrich, D. (2006). Purification and characterisation of an intracellular enzyme with β-glucosidase and β-galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. *Journal of Biotechnology*, 123(3), 304-313.
- Nam, K. H., Sung, M. W., & Hwang, K. Y. (2010). Structural insights into the substrate recognition properties of β-glucosidase. *Biochemical and biophysical research communications*, 391(1), 1131-1135.
- Nevalainen, K. H., Te'o, V. S., & Bergquist, P. L. (2005). Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in biotechnology*, 23(9), 468-474.
- Pakarinen, A., Haven, M. Ø., Djajadi, D. T., Várnai, A., Puranen, T., & Viikari, L. (2014). Cellulases without carbohydrate-binding modules in high consistency ethanol production process. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 1.
- Pal, S., Banik, S. P., Ghorai, S., Chowdhury, S., & Khowala, S. (2010). Purification and characterization of a thermostable intra-cellular β-glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. *Bioresource Technology*, 101(7), 2412-2420.
- Park, I. H., Chang, J., Lee, Y. S., Fang, S. J., & Choi, Y. L. (2012). Gene cloning of endoglucanase Cel5A from cellulose-degrading *Paenibacillus xylanilyticus* KJ-03 and purification and characterization of the recombinant enzyme. *The protein journal*, 31(3), 238-245.
- Park, T. H., Choi, K. W., Park, C. S., Lee, S. B., Kang, H. Y., Shon, K. J., ... & Cha, J. (2005). Substrate specificity and transglycosylation catalyzed by a thermostable β-glucosidase from marine hyperthermophile *Thermotoga neapolitana*. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(4), 411-422.



- Parry, N. J., Beever, D. E., Owen, E., Nerinckx, W., Claeysens, M., Van Beeumen, J., & Bhat, M. K. (2002). Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 404(2), 243-253.
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., ... & Beckham, G. T. (2015). Fungal cellulases. *Chemical Reviews*, 115(3), 1308-1448.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8(10), 785-786.
- Peterson, R., & Nevalainen, H. (2012). *Trichoderma reesei* RUT-C30—thirty years of strain improvement. *Microbiology*, 158(1), 58-68.
- Petroleum, B. (2015). BP Statistical Review of World Energy June 2015, 2015. *London, UK: British Petroleum Google Scholar*.
- Piumi, F., Levasseur, A., Navarro, D., Zhou, S., Mathieu, Y., Ropartz, D., ... & Record, E. (2014). A novel glucose dehydrogenase from the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: production in *Aspergillus niger* and physicochemical characterization of the recombinant enzyme. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(24), 10105-10118.
- Poidevin, L., Feliu, J., Doan, A., Berrin, J. G., Bey, M., Coutinho, P. M., ... & Heiss-Blanquet, S. (2013). Insights into exo-and endoglucanase activities of family 6 glycoside hydrolases from *Podospora anserina*. *Applied and environmental microbiology*, 79(14), 4220-4229.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(5), 577-591.
- Pollet A, Delcour JA, Courtin CM (2010) Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Crit Rev Biotechnol* 30(3):176–191
- Punt, P. J., Burlingame, R. P., Pynnonen, C. M., Olson, P. T., Wery, J., & Visser, J. (2010). *Chrysosporium lucknowense* protein production system. Patent WO/2010/107303.
- Rahikainen, J. L., Martin-Sampedro, R., Heikkinen, H., Rovio, S., Marjamaa, K., Tamminen, T., ... & Kruus, K. (2013). Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: the effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. *Bioresource technology*, 133, 270-278

- Ramani, G., Meera, B., Vanitha, C., Rao, M., & Gunasekaran, P. (2012). Production, purification, and characterization of a  $\beta$ -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(5), 959-972.
- Ratanakhanokchai, K., Waeonukul, R., Pason, P., Aachaapaikoon, C., Kyu, K. L., Sakka, K., ... & Mori, Y. (2013). *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 multienzyme complex: A novel system for biomass utilization. *Biomass Now-Cultivation and Utilization*.
- Renewable Fuels Association. (2013). Industry statistics: annual world ethanol production by country. <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics>
- Riou, C., Salmon, J. M., Vallier, M. J., Günata, Z., & Barre, P. (1998). Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3607-3614.
- Rosgaard, L., Pedersen, S., Langston, J., Akerhielm, D., Cherry, J. R., & Meyer, A. S. (2007). Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates. *Biotechnology progress*, 23(6), 1270-1276.
- Roy, S. K., Raha, S. K., Sadhukhan, R. K., & Chakrabarty, S. L. (1991). Purification and characterization of extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(6), 613-618.
- Saha, B. C., & Bothast, R. J. (1996). Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3165-3170.
- Schülein, M. (1997). Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *Journal of biotechnology*, 57(1), 71-81.
- Shenef, A., El-Tanash, A., & Atia, N. (2010). Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. *Research Journal of Microbiol*, 5(3), 199-211.
- Sherief, A. A., El-Tanash, A. B., & Atia, N. (2010). Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. *Research Journal of Microbiology*, 5(3), 199-211.
- Shin, K., Kim, Y. H., Jeya, M., Lee, J. K., & Kim, Y. S. (2010). Purification and characterization of a thermostable cellobiohydrolase from *Fomitopsis pinicola*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(12), 1681-1688.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... & Thompson, J. D. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1).

- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., & Srivastava, M. (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 713-728.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 127, 500-507.
- Sørensen, A., Ahring, B. K., Lübeck, M., Ubhayasekera, W., Bruno, K. S., Culley, D. E., & Lübeck, P. S. (2012). Identifying and characterizing the most significant  $\beta$ -glucosidase of the novel species *Aspergillus saccharolyticus*. *Canadian journal of microbiology*, 58(9), 1035-1046.
- Sørensen, A., Lübeck, M., Lübeck, P. S., & Ahring, B. K. (2013). Fungal beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules*, 3(3), 612-631.
- Souza, F. H. M., Meleiro, L. P., Machado, C. B., Zimbardi, A. L. R. L., Maldonado, R. F., Souza, T. A. C. B., ... & Furriel, R. P. M. (2014). Gene cloning, expression and biochemical characterization of a glucose-and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from *Humicola insolens* RP86. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 106, 1-10.
- Souza, F. H. M., Nascimento, C. V., Rosa, J. C., Masui, D. C., Leone, F. A., Jorge, J. A., & Furriel, R. P. M. (2010). Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose-and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. *Process Biochemistry*, 45(2), 272-278.
- Stals, I., Sandra, K., Devreese, B., Van Beeumen, J., & Claeysens, M. (2004). Factors influencing glycosylation of *Trichoderma reesei* cellulases. II: N-glycosylation of Cel7A core protein isolated from different strains. *Glycobiology*, 14(8), 725-737.
- Stals, I., Sandra, K., Geysens, S., Contreras, R., Van Beeumen, J., & Claeysens, M. (2004). Factors influencing glycosylation of *Trichoderma reesei* cellulases. I: Postsecretorial changes of the O-and N-glycosylation pattern of Cel7A. *Glycobiology*, 14(8), 713-724.
- Strobel, K. L., Pfeiffer, K. A., Blanch, H. W., & Clark, D. S. (2015). Engineering Cel7A carbohydrate binding module and linker for reduced lignin inhibition. *Biotechnology and bioengineering*.
- Sun, J., Phillips, C. M., Anderson, C. T., Beeson, W. T., Marletta, M. A., & Glass, N. L. (2011). Expression and characterization of the *Neurospora crassa* endoglucanase GH5-1. *Protein expression and purification*, 75(2), 147-154.
- Sun, X., Zhu, J., Bao, L., Hu, C., Jin, C., Harris, S., ... & Li, S. (2013). pyrG is required for maintaining stable cellular uracil level and normal sporulation pattern under excess uracil stress in *Aspergillus nidulans*. *Science China Life Sciences*, 56(5), 467-475.

- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.
- Sunna, A., Moracci, M., Rossi, M., & Antranikian, G. (1997). Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles*, 1(1), 2-13.
- Szjártó, N., Siika-Aho, M., Sontag-Strohm, T., & Viikari, L. (2011). Liquefaction of hydrothermally pretreated wheat straw at high-solids content by purified *Trichoderma* enzymes. *Bioresource technology*, 102(2), 1968-1974.
- Tao, L., Schell, D., Davis, R., Tan, E., Elander, R., & Bratis, A. (2014). *NREL 2012 Achievement of Ethanol Cost Targets: Biochemical Ethanol Fermentation via Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover* (No. NREL/TP-5100-61563). National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO.
- Teleman, A., Koivula, A., Reinikainen, T., Valkeajärvi, A., Teeri, T. T., Drakenberg, T., & Teleman, O. (1995). Progress-Curve Analysis Shows that Glucose Inhibits the Cellotriose Hydrolysis Catalysed by Cellobiohydrolase II from *Trichoderma Reesei*. *European journal of biochemistry*, 231(1), 250-258.
- Teter, S. A. (2012). *DECREASE Final Technical Report: Development of a Commercial Ready Enzyme Application System for Ethanol* (No. DOE/GO/18080). Novozymes Inc, Davis CA.
- Thangavelu, S. K., Ahmed, A. S., & Ani, F. N. (2016). Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 56, 820-835.
- Tishkov, V. I., Gusakov, A. V., Cherkashina, A. S., & Sinitsyn, A. P. (2013). Engineering the pH-optimum of activity of the GH12 family endoglucanase by site-directed mutagenesis. *Biochimie*, 95(9), 1704-1710.
- Tomme, P., Tilbeurgh, H., Pettersson, G., Damme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., ... & Claeyssens, M. (1988). Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. *European Journal of Biochemistry*, 170(3), 575-581.
- Tuohy, M. G., Walsh, D. J., Murray, P. G., Claeyssens, M., Cuffe, M. M., Savage, A. V., & Coughlan, M. P. (2002). Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1596(2), 366-380.
- U.S. Department of Energy, Office of the Biomass Program, 30 x 30 Workshop, Washington, DC, 1 to 2 August, 2006
- Uzcategui, E., ..., & Pettersson, G. (1991). The 1, 4- $\beta$ -D-glucan glucanohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. Re-assessment of their significance in cellulose degradation mechanisms. *Journal of biotechnology*, 21(1-2), 143-159.

- Uzcategui, E., Ruiz, A., Montesino, R., Johansson, G., & Pettersson, G. (1991). The 1, 4- $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*. *Journal of biotechnology*, 19(2-3), 271-285.
- Van den Brink, J., & de Vries, R. P. (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(6), 1477-1492.
- Varrot, A., Hastrup, S., Schülein, M., & Davies, G. J. (1999). Crystal Structure of the Catalytic Core Domain of the Family 6 Cellobiohydrolase II, Cel6a, from *Humicola insolens*, at 1.92 Å Resolution. *Biochemical Journal*, 337(2), 297-304.
- Varrot, A., Frandsen, T. P., Driguez, H., & Davies, G. J. (2002). Structure of the *Humicola insolens* cellobiohydrolase Cel6A D416A mutant in complex with a non-hydrolysable substrate analogue, methyl cellobiosyl-4-thio- $\beta$ -cellobioside, at 1.9 Å. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(12), 2201-2204.
- Varrot, A., Frandsen, T. P., von Ossowski, I., Boyer, V., Cottaz, S., Driguez, H., ... & Davies, G. J. (2003). Structural basis for ligand binding and processivity in cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens*. *Structure*, 11(7), 855-864.
- Verdoes, J. C., Punt, P. J., Burlingame, R., Bartels, J., Van Dijk, R., Slump, E., ... & Emalfarb, M. (2007). A dedicated vector for efficient library construction and high throughput screening in the hyphal fungus. *Chrysosporium lucknowense*, 48-57.
- Viikari, L., Vehmaanperä, J., & Koivula, A. (2012). Lignocellulosic ethanol: from science to industry. *Biomass and Bioenergy*, 46, 13-24.
- Visser, H., Joosten, V., Punt, P. J., Gusakov, A. V., Olson, P. T., Joosten, R., ... & Verdoes, J. C. (2011). RESEARCH: Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora thermophila* isolate, previously known as *Chrysosporium lucknowense* C1. *Industrial Biotechnology*, 7(3), 214-223.
- Vlasenko, E., Schülein, M., Cherry, J., & Xu, F. (2010). Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. *Bioresource Technology*, 101(7), 2405-2411.
- Voet, D., & Voet, J. G. (2006). *Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana.
- Volkov, P. V., Rozhkova, A. M., Gusakov, A. V., & Sinitsyn, A. P. (2014). Homologous cloning, purification and characterization of highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Penicillium canescens*. *Protein expression and purification*, 103, 1-7.

- Voutilainen, S. P., Boer, H., Linder, M. B., Puranen, T., Rouvinen, J., Vehmaanperä, J., & Koivula, A. (2007). Heterologous expression of *Melanocarpus albomyces* cellobiohydrolase Cel7B, and random mutagenesis to improve its thermostability. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(3), 234-243.
- Voutilainen, S. P., Nurmi-Rantala, S., Penttilä, M., & Koivula, A. (2014). Engineering chimeric thermostable GH7 cellobiohydrolases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(7), 2991-3001.
- Voutilainen, S. P., Puranen, T., Siika-aho, M., Lappalainen, A., Alapuranen, M., Kallio, J., ... & Koivula, A. (2008). Cloning, expression, and characterization of novel thermostable family 7 cellobiohydrolases. *Biotechnology and bioengineering*, 101(3), 515-528.
- Vu, V. V., Beeson, W. T., Phillips, C. M., Cate, J. H., & Marletta, M. A. (2013). Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 136(2), 562-565.
- Vuong, T. V., & Wilson, D. B. (2009). Processivity, synergism, and substrate specificity of *Thermobifida fusca* Cel6B. *Applied and environmental microbiology*, 75(21), 6655-6661.
- Wang, H. C., Chen, Y. C., Huang, C. T., & Hseu, R. S. (2013). Cloning and characterization of a thermostable and pH-stable cellobiohydrolase from *Neocallimastix patriciarum* J11. *Protein expression and purification*, 90(2), 153-159.
- Wang, T., Liu, X., Yu, Q., Zhang, X., Qu, Y., Gao, P., & Wang, T. (2005). Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *Biomolecular engineering*, 22(1), 89-94.
- Ward, O. P. (2012). Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology advances*, 30(5), 1119-1139.
- Withers, S. G. (2001). Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydrate polymers*, 44(4), 325-337.
- Wu, I., Heel, T., & Arnold, F. H. (2013). Role of cysteine residues in thermal inactivation of fungal Cel6A cellobiohydrolases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(8), 1539-1544.
- Xiros, C., Topakas, E., & Christakopoulos, P. (2013). Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment*, 2(6), 633-654.
- Yan, T. R., & Lin, C. L. (1997). Purification and characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(6), 965-970.



- Yeoman, C. J., Han, Y., Dodd, D., Schroeder, C. M., Mackie, R. I., & Cann, I. K. (2010). Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Advances in applied microbiology*, 70, 1-55.
- Yoon, J. J., Kim, K. Y., & Cha, C. J. (2008). Purification and characterization of thermostable  $\beta$ -glucosidase from the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on microcrystalline cellulose. *The Journal of Microbiology*, 46(1), 51-55.
- Zhang, G. C., Liu, J. J., Kong, I. I., Kwak, S., & Jin, Y. S. (2015). Combining C6 and C5 sugar metabolism for enhancing microbial bioconversion. *Current opinion in chemical biology*, 29, 49-57.
- Zhang, Y. B., Yuan, L. J., Chen, Z. J., Fu, L., Lu, J. H., Meng, Q. F., ... & Teng, L. R. (2011). Purification and characterization of beta-glucosidase from a newly isolated strain *Tolypocladium cylindrosporum* Syzx4. *Chem. Res. Chin. Univ*, 27, 557-561.
- Zhao, J., Guo, C., Tian, C., & Ma, Y. (2015). Heterologous Expression and Characterization of a GH3  $\beta$ -Glucosidase from Thermophilic Fungi *Myceliophthora thermophila* in *Pichia pastoris*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 177(2), 511-527.
- Zoglowek, M., Lübeck, P. S., Ahring, B. K., & Lübeck, M. (2015). Heterologous expression of cellobiohydrolases in filamentous fungi—An update on the current challenges, achievements and perspectives. *Process Biochemistry*, 50(2), 211-220.